



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

Programa de Doctorado en Patología de los Tumores Humanos

**PAPEL DE LOS RECEPTORES ANGIOGÉNICOS DEL VEGF EN LA APOPTOSIS Y
MIGRACIÓN CELULAR DE LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA-B. CORRELACIÓN
CON LOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CXCR4, CCR7 Y CD49d Y LAS
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR

SANDRA BALLESTER GARCÍA

DIRIGIDA POR

DRA. MARIA JOSÉ TEROL CASTERÁ

DRA. PILAR EROLES ASENSIO

DR. ANTONIO FERRÁNDEZ IZQUIERDO

Valencia 2015



Fundación Investigación Clínico de Valencia
Instituto de Investigación Sanitaria – INCLIVA

María José Terol Casterá, doctora en Medicina, profesora asociada del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València y médico adjunto del Servicio de Hematología y Oncología del Hospital Clínico Universitario de Valencia

Dra. Pilar Eroles Asensio, investigadora del Instituto de Investigación de Investigación Sanitaria INCLIVA.

Dr. Antonio Ferrández Izquierdo, doctor en Medicina, profesor titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València y Médico Adjunto del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por Sandra Ballester García, titulada **“Papel de los receptores angiogénicos del VEGF en la apoptosis y migración celular de la leucemia linfática crónica-B. Correlación con los receptores de quimiocinas CXCR4, CCR7 Y CD49d y las características clínicas de los pacientes”**, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todas las condiciones requeridas para la obtención del título de Doctora.

En Valencia, Octubre de 2015

María José Terol Casterá

Pilar Eroles Asensio

Antonio Ferrández Izquierdo

La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real.

Es un viaje, nunca una llegada.

Karl Raimund Popper

AGRADECIMIENTOS

A los directores y codirectores de esta tesis doctoral: María José Terol Casterá, Pilar Eroles Asensio y Antonio Ferrandez Izquierdo, por sus consejos y dirección en la elaboración de este proyecto de investigación.

Quiero empezar por agradecer especialmente a M^a José Terol la oportunidad que me ha dado de formar parte de su grupo todos estos años y la confianza que siempre ha depositado en mí. Gracias por tus brillantes lecciones y enseñanzas M^a José, y principalmente gracias por tu ayuda permanente, tanto a nivel profesional como personal. Para mí siempre serás un referente de mujer luchadora, gran profesional y mejor persona.

Me gustaría agradecer y dedicar este trabajo a todos los pacientes y donantes de sangre por su implicación indirecta en el desarrollo de esta tesis; colaborar en la investigación a pesar de sus posibles dolencias físicas y emocionales los convierten en un pilar fundamental de este estudio.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios de oncología de la UCIM, del servicio de Hematología del Hospital Clínico, estudiantes, residentes y colaboradores de los que tanto hemos aprendido enseñándoles en el laboratorio. También quiero dar las gracias a todo el personal de INCLIVA por su labor en la gestión de los proyectos de investigación que han dado lugar a este trabajo, especialmente quiero agradecer a Justo G. y Enrique C. su gran ayuda, apoyo y tantos ánimos recibidos. No quiero olvidarme de agradecer al personal de los servicios de la UCIM de la Universidad de Valencia, y especialmente a Sonia P. y a Sergio B., el recibirme siempre con una sonrisa y facilitarme el trabajo.

También me gustaría expresar mis agradecimientos al Dr. Viña, por la forma en que contagia su pasión por la ciencia, por su gran implicación con los jóvenes y por su motivación e insistencia en la escritura de mi tesis.

Querría nombrar a todos y a cada una de las personas con quien he tenido la suerte de coincidir en este camino y compartir grandes momentos científicos y otros no tanto; por tantas risas, algunas lágrimas y por todas las horas vividas juntos. Sin embargo, afortunadamente son tantas personas que necesitaría introducir diez hojas más en este apartado para poder reconocérselo a todos: Joana, Ariadna, Blanca, María, Fernando, Vicent, Carla, Víctor, Diego, Isa, Jenny, Ana, Paula, Iris, Carlos, Andreu, Alba, Gloria, Mainer, María, Maite, Marta, Sara, Jessica... Gracias Joan, Alberto, Jaume y Rai por los mil abrazos y guiños que me regaláis cada día en el laboratorio y fuera de él. En especial quiero mencionar a Pilar E. por su implicación en la dirección de la tesis y por todos los años de trabajo y amistad que nos unen; a Begoña P. por sus consejos tranquilizadores y su aliento en los momentos de flaqueza; a Patricia R. que lamentablemente ya no trabaja conmigo pero cuya amistad ha sido tan importante para mí durante estos años y los que nos quedan; y por último a Edu T. por ser como es, siempre dispuesto a ayudarme, por dejarme aprender de él y por su inigualable *estado zen* que tan vital ha sido y es para poder seguir en el mundo de la investigación y en este camino que llamamos vida.

También quiero compartir esta aventura con mis mejores amigos que comprenden el esfuerzo que supone dedicarse a la investigación y pese a ello, siempre están ahí: Cristina, Iván, Laura, Raquel, Tere y Toni.

A Javi y Almudena por la fuerza y el empuje que transmiten, y a esas dos personitas tan especiales, mis sobrinos Xavi y Leire.

A Juan, por ver siempre el lado positivo de las cosas y desprender alegría y vitalidad por todos los poros de su piel. A mis sobrinos Pau y Leo por tener la sonrisa puesta cada vez que los miro, envolverme de felicidad y poder disfrutar de ellos en cada momento. Me siento muy orgullosa de ser vuestra tita.

A **Vicente**, por hacer siempre lo que está en su mano para ayudarme, por soportar mis malos momentos al llevar a casa los problemas del trabajo y pese a ello, seguir tendiéndome la mano cada vez que me caigo. Por aguantar mi carácter, por darme el mejor regalo que me podían hacer y por ser el mejor padre que existe. Te doy mil gracias por compartir la vida conmigo y hacerme el camino más fácil. Gracias por tu gran comprensión.

A **Unai**, ese bichito que me quita el sueño, pero me da la vida. A mi “bolita”, mi luz en la oscuridad, que sin saberlo cambió mi vida desde que apenas medía 1 cm y me hizo sentir la mujer más feliz del mundo, ahora que ya alcanza 1 metro también mi felicidad se multiplica por cien.

Y sobre todo, quiero agradecer, dedicar y compartir este gratificante logro personal y profesional con **mis padres** y mi hermana **Raquel** por todo el apoyo incondicional recibido. Gracias por preocuparos tanto por mí, por dar siempre sin esperar nada a cambio, por educarme y formarme como persona, y como no: por la increíble herencia genética recibida ;-). Aprovecho este momento para decir lo que tanto siento pero que tanto me cuesta deciros: *os quiero mucho.*

RESUMEN

La leucemia linfática crónica B es un síndrome linfoproliferativo caracterizado por un balance entre la proliferación celular en los tejidos y la apoptosis espontánea que se traduce en un incremento progresivo de linfocitos neoplásicos en sangre periférica con invasión de ganglios y medula ósea. La migración celular depende de la expresión de factores pro-angiogénicos y de los receptores de quimiocinas de las células B-LLC, que favorecen la diseminación y prolongan la supervivencia de estas células. En este trabajo de investigación analizamos los niveles de expresión de los receptores angiogénicos VEGF-R1, VEGF-R2 y VEGF-R3 en células de LLC-B por citometría de flujo y PCR cuantitativa así como de los factores de crecimiento VEGF y bFGF y la regulación de la producción de la metaloproteinasa-9. Así mismo, determinamos el efecto de la vía VEGF/VEGF-R en la apoptosis y migración de células LLC-B y correlacionamos los datos obtenidos con los patrones de expresión de CXCR4 y CCR7 y de la integrina CD49d ($\alpha 4\beta 1$) como con las características clínicas y biológicas de los pacientes. Los resultados obtenidos permiten mejorar la identificación de grupos de pacientes con diferente capacidad de respuesta a VEGF. Del mismo modo, los resultados sugieren el potencial papel de VEGF y del receptor de quimiocinas CXCR4 como dianas terapéuticas de la enfermedad.

Por otro lado, dado que unos niveles elevados de expresión de los factores angiogénicos VEGF y bFGF se relacionan con un mal pronóstico en LLC-B, estudiamos también en una serie de 230 pacientes, los polimorfismos 936 C/T rs3025039, rs 833052, rs 1109324 y rs 1547651 del gen *VEGF*; -710 C/T del gen *VEGF-R1*; y 223 C/T del gen *bFGF*. Los resultados muestran que el alelo 936T en el SNP rs3025039 del gen *VEGF* se asocia con un menor riesgo de desarrollar LLC-B. Por su parte, la variante genotípica T/- del SNP rs1449683 en el gen *bFGF* juega un papel importante en la iniciación de la enfermedad y en su progresión, mostrando una reducción de la supervivencia. El patrón de expresión obtenido puede mejorar el proceso de adopción de decisiones clínicas en base al subgrupo de riesgo del paciente.

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia is a lymphoproliferative disorder characterized by inhibition of the apoptosis which translates into a progressive increase in the amount of neoplastic lymphocytes in peripheral blood and the invasion of lymph node and bone marrow. The cell migration depends on the expression of pro-angiogenic factors and the B-CLL cell chemokine receptors. These factors would favor dissemination and prolongation of cells survival. In this research we analyzed the expression levels of angiogenic receptors VEGF-R1, VEGF-R2 and VEGF-R3 by flow cytometry and RT-qPCR and VEGF and bFGF growth factors and regulating the production of matrix metalloproteinase-9. Furthermore, we determined the effect of the VEGF / VEGF-R pathway in apoptosis and migration of B-CLL cells, and correlated the data patterns with the expression of CXCR4 and CCR7 and $\alpha 4\beta 1$ integrin as well as with clinical and biological characteristics patients. Results allow better identification of patient groups with different responsiveness to VEGF. Moreover, results suggest a potential role of VEGF and chemokines CXCR4 receptor as therapeutic targets for the disease.

Since, high levels of expression of the angiogenic factors VEGF and bFGF are associated with poor prognosis in B-CLL, we also studied, in 230 patients, polymorphisms in 936 C/T rs3025039, rs 833052, rs 1109324 and rs 1547651 of the *VEGF* gene; -710 C/T of the *VEGF-R1* gene; and polymorphism 223 C/T of the *bFGF* gene. The 936T allele at SNP rs3025039 of the *VEGF* gene is associated with a lower risk of B-CLL while variant genotype T/- SNP rs1449683 in the *bFGF* gene contributes to disease initiation and progression, showing a reduction in survival. The expression pattern obtained can help decision making based on the risk profile of the patient.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Leucemia linfática crónica B	3
1.1 Generalidades	3
1.2 Diagnóstico.....	5
1.2.1 Presentación clínica.....	5
1.2.2 Morfología e inmunofenotipo	5
1.3 Sistemas de estadiaje.....	7
1.4 Factores pronóstico	10
1.4.1 Factores pronóstico clásicos.....	10
1.4.2 Nuevos factores pronóstico	12
1.4.3 Evolución clonal.....	18
1.5 Tratamiento	18
1.5.1 Criterios de inicio de tratamiento	18
1.5.2 Tipos de tratamiento.....	19
1.5.2.1 Quimioterapia.....	20
1.5.2.2 Inmunoterapia.....	21
1.5.2.3 Quimioinmunoterapia.....	23
1.5.2.4 Nuevos agentes terapéuticos	25
1.5.2.5 Inmunomoduladores.....	30
1.5.2.6 Valoración de respuesta	31
2. Etiología y patogenia de la LLC-B	32
2.1 Origen celular.....	32
2.1.1 Linfocitosis B monoclonal (LBM).....	34
2.1.2 Célula B ROR1+	35
2.1.3 Papel de las células pluripotenciales (<i>stem cells</i>).....	35
2.2 El microambiente celular	37
2.2.1 Efectos del microambiente celular en la LLC-B	37

2.2.2 Mecanismos de progresión y homing en la LLC-B.....	40
2.2.2.1 Quimiocinas y sus receptores.....	40
2.2.2.2 Moléculas de adhesión.....	44
2.2.2.3 El receptor de la célula B (BCR).....	48
2.3 Modelo patogénico.....	53
3. Angiogénesis en la LLC-B.....	55
3.1 Generalidades.....	55
3.2 Familia VEGF y su función.....	56
3.2.1 Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular VEGFR-1.....	57
3.2.2 Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular VEGFR-2 (KDR).....	58
3.2.3 Receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular VEGFR-3.....	59
3.3 VEGF como factor pro-angiogénico en la LLC-B.....	60
3.4 Papel del VEGF en la supervivencia celular de la LLC-B.....	60
3.5 VEGF como regulador de la migración. Implicación en el microambiente.....	61
3.6 Implicación pronóstica de VEGF.....	63
3.7 Polimorfismos de VEGF, VEGFR-1 y bFGF.....	64
1. Hipótesis.....	69
2. Objetivos.....	70
2.1. Objetivos específicos.....	70
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	71
1. Pacientes.....	73
1.1 Características clínico biológicas.....	73
1.2 Procesado de las muestras.....	74
1.3 Estudio inmunofenotípico, morfológico, citogenético y molecular.....	75
1.3.1 Estudio inmunofenotípico.....	75
1.3.1.1 Estudio del antígeno de superficie CD38.....	77

1.3.1.2 Determinacion de zap-70	77
1.3.2 Estudio morfológico.....	78
1.3.3 Estudio citogenético	78
1.3.4 Estudio molecular.....	80
1.3.4.1 Estado mutacional de la región variable del gen de las inmunoglobulinas IgVH	80
2. Estudio de los receptores angiogénicos de VEGF y MMP-9	82
2.1 Niveles de expresión de superfiie de VEGF-R1, VEGF-R2 y VEGF-R3.....	82
2.2 Expresión intracelular de MMP-9 y VEGF	83
3. Técnicas de ELISA empleadas en la cuantificación del nivel sérico de VEGF	84
4. PCR cuantitativa en el análisis de expresión de VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3 y bFGF	84
5. Cultivos celulares.....	85
5.1 Condiciones de los cultivos celulares.....	85
5.2 Congelación-descongelación.....	86
5.3 Líneas celulares utilizadas.....	87
5.4 Sistema de co-cultivo celular	91
5.4.1 Estudio del efecto de la vía VEGF/VEGF-R sobre la apoptosis y migración celular de las células B en la LLC.....	91
5.4.1.1 Citometría de flujo en el estudio de apoptosis celular.....	91
5.4.1.2 Migración celular	92
5.4.2 Análisis de expresión de quimiocinas CXCR4, CCR7 y CD49d	94
5.4.3 Sistema de cultivo mediante la línea estromal NKTert y células dendríticas HK para el estudio de la apoptosis in vitro inducida por inhibidores de quinasa	95
6. Técnica de microscopía confocal.....	97
6.1 Expresión de CXCR4.....	97
6.2 Co-localización CXCR4-Lyn en los <i>lipids raft</i> de la membrana celular	99
7. Análisis de expresión proteica mediante la técnica de <i>Western blot</i>	100

7.1 Extracción de proteínas	101
7.1.1 Extracción proteína total	101
7.1.2 Extracción de proteínas de membrana.....	102
7.2 Cuantificación proteínas.....	104
7.2.1 Método Bradford.....	104
7.2.2 Método Lowry.....	104
7.3 Protocolo de <i>Western blot</i>	104
8. Polimorfismos en los genes <i>VEGF</i> , <i>VEGF-R1</i> y <i>bFGF</i>	108
8.1 Extracción de ácidos nucleicos	109
8.2 Método de detección de SNPs.....	109
9. Análisis estadístico	110
9.1 Variables estudiadas.....	110
9.2 Métodos estadísticos utilizados en los análisis.....	111
9.2.1 Análisis descriptivo univariante	111
9.2.2 Análisis bivariante.....	111
9.2.3 Análisis de supervivencia.....	113
IV. RESULTADOS	115
1. Descripción general de los sujetos incluidos en el estudio	117
1.1 Análisis de la supervivencia.....	118
2. Estudio de expresión de los receptores angiogénicos de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3), de MMP-9 y de bFGF	123
2.1 Expresión diferencial de los receptores de superficie membrana VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y la expresión intracitoplasmática de MMP-9 y VEGF por CMF en pacientes con LLC-B y donantes sanos	123
2.2 Cuantificación de la expresión génica de VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3 y bFGF por RTqPCR	125
2.3 Estudio de VEGF sérico mediante técnicas de ELISA	127

2.4 Correlación de resultados con las principales características clínicas y biológicas de los pacientes LLC-B	128
2.5 Impacto en la supervivencia	138
3. Estudio del papel de la vía VEGF/VEGF-R en la apoptosis y migración celular de la LLC-B y su correlación con la expresión de MMP-9, CXCR4, CCR7 y CD49d	139
3.1 Implicación de la vía VEGF/VEGF-R en la viabilidad celular mediante la utilización de inhibidores específicos	139
3.1.1 Efecto del microambiente celular en la supervivencia de células LLC-B.....	141
3.2 Implicación de la vía VEGF/VEGF-R en la migración celular y expresión de receptores de quimiocinas CXCR4, CCR7 y CD49d.....	144
3.2.1 Influencia en la expresión de las quimiocinas CXCR4, CCR7 y CD49d.....	144
3.2.2 Influencia de la vía VEGF/VEGFR en la migración celular.....	150
3.3 Análisis de la expresión de CXCR4 mediada por VEGF mediante técnicas de microscopía confocal y Western blot	154
3.4 Co-localización de CXCR4-Lyn en los <i>lipid raft</i>	166
3.5 Correlación de resultados con las características clínicas y biológicas de los pacientes.....	169
4. Estudio de los polimorfismos genéticos del VEGF, VEGF-R1, bFGF y su implicación clínica.....	171
4.1 SNPs y riesgo a la enfermedad LLC-B	171
4.2 Análisis de haplotipos del gen <i>VEGF</i> y riesgo a la enfermedad LLC-B.....	174
4.3 Asociación de los haplotipos del <i>VEGF</i> con la supervivencia.....	176
4.4 Correlación de los SNPs en el <i>VEGF</i> , <i>VEGF-R1</i> y <i>bFGF</i> con los factores clínico-patológicos de los pacientes LLC-B. Impacto pronóstico de los SNPs estudiados en la supervivencia.....	179
V. DISCUSIÓN	183

1. Estudio de expresión de membrana y expresión intracitoplasmática de los receptores de VEGF y MMP-9 y la expresión génica de VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y bFGF. Correlación de resultados con las principales características clínicas y biológicas de los pacientes LLC-B.	187
2. Estudio del papel de la vía VEGF/VEGF-R en la apoptosis y la migración celular en la LLC-B y su correlación con la expresión de CXCR4, CCR7 y CD49d. Correlación de resultados con las principales características clínicas y biológicas de los pacientes LLC-B	189
3. Estudio de polimorfismos genéticos del VEGF, VEGF-R1, bFGF y su valor pronóstico en la LLC-B	197
VI. CONCLUSIONES	203
VII. BIBLIOGRAFÍA	207
ANEXOS	233
1. Compromiso ético de los investigadores	235
2. Información para cada sujeto participante en el estudio	236
3. Consentimiento informado	237

AcMo: Anticuerpo monoclonal

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BCR: *B-cell receptor*, receptor de células B

BM: *Bone marrow*, médula ósea

BSA: *Bovine serum albumin*, albúmina de suero bovino

bFGF: *Basic fibroblast growth factor*, factor de crecimiento de fibroblastos básico

CARs: *Chimeric antigen receptors*, receptores de antígenos quiméricos

CCR7: *C-C chemokine receptor type 7*

CD: *Cluster of differentiation*, grupos de diferenciación

CD49d: *Integrin alpha subunit*

CFM: Ciclofosfamida

CI: *Confidence interval*, intervalo de confianza

CL: Clorambucil

CL-O: Clorambucil asociado a ofatumomab

CL-Ob: Clorambucil asociado a obinutuzumab

CL-R: Clorambucil asociado a rituximab

CMF: Citometría de flujo

CXCR4: *C-X-C chemokine receptor type 4*

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etilen-diamino-tetraacético

EGF: *Epidermal growth factor*, factor de crecimiento epidermal

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EMR: Enfermedad mínima residual

ERK: *Extracelular signal-regulated kinase*, quinasa regulada por señales extracelulares

F: Fludarabina

FBS: *Fetal bovine serum*, suero bovino fetal

FC: Fludarabina ciclofosfamida

FCR: Fludarabina ciclofosfamida asociado a rituximab

FGF: *Fibroblast growth factor*, factor de crecimiento de fibroblastos

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína

FISH: *Fluorescence in situ hybridization*, hibridación in situ fluorescente

FLT1: *Vascular endothelial growth factor receptor 1*, VEGFR-1

FLT4: *Vascular endothelial growth factor receptor 3*, VEGFR-3

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

Hb: Hemoglobina

HUVEC: *Human umbilical vein endothelial cell*, célula endotelial de venas de cordón umbilical humano

ILP: Intervalo libre de progresión

ILT: Intervalo libre de tratamiento

IMF: Intensidad de fluorescencia media

KDR: *Vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2*

TK: Tirosín quinasa

LDH: Lactato deshidrogenasa

LLC: Leucemia linfática crónica

LLC-B: Leucemia linfática crónica de tipo B

LMC: Leucemia mieloide crónica

LYN: *Tyrosine-protein kinase Lyn, proteína quinasa Lyn*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase, quinasa activada por mitógenos*

M: Mitoxantrone

MI: Índice de migración, *migration index*

MMP: *Matrix metalproteinase, metaloproteínasa de matriz*

MMP-9: *Matrix metalproteinase-9, metaloproteínasa de matriz-9*

MO: Médula ósea

MSCs: *Mesenchymal stem cells o Mesenchymal stromal cells, células madre estromales*

NF- κ B: *Nuclear factor- κ B, factor nuclear κ B*

NGS: *Next generation sequencing, secuenciación de próxima generación (secuenciación masiva)*

Nt: Nucleótido

OR: *Odds ratio*

PAGE: *Polyacrylamide gel electrophoresis, electroforesis en gel de poliacrilamida*

Pb: Pares de bases

PBL: *Peripheral blood lymphocyte*, linfocito de sangre periférica

PBMCs: *Peripheral blood mononuclear cells*, células mononucleares de sangre periférica.

PBS: *Phosphate buffered saline*, solución salina tamponada con fosfatos

PDGFRs: *Platelet derived growth factor receptor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas

PE: Ficoeritrina

PI3-K: *Phosphatidylinositol-3 kinase*, quinasa fosfatidilinositol-3

PLGF: *Placental growth factor*, factor de crecimiento placentario

RC: Respuestas completas

RG: Respuestas globales

RP: Respuesta parcial

R.P.M: Revoluciones por minuto

R/R: Recaída/Refractario

RT: *Room temperature*, temperatura ambiente

RT-PCR: *Reverse transcription-polymerase chain reaction*, ensayo de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa

SDF-1: *Stromal-cell derived factor-1*, factor derivado de células estromales-1

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*, dodecilsulfato de sodio

SG: Supervivencia global

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

SLP: Supervivencia libre de progresión

SLPC: Síndromes linfoproliferativos crónicos

SLR: Supervivencia libre de recaída

SLT: Supervivencia libre de tratamiento

SMD: Síndrome mielodisplásico

SNPs: *Single nucleotide polymorphisms*, polimorfismo de un solo nucleótido

SP: Sangre periférica

STAT: *Signal transducer and activator of transcription*, transductor de señal y activador de transcripción

TBS: *Tris buffered saline*, solución salina tamponada con Tris

TC: Tomografía computarizada

TCR: *T-cell receptor*, receptor de células T

TDL: Tiempo de duplicación linfocitario

TGF- β : *Tumor growth factor- β* , factor de crecimiento tumoral β

TLR: *Toll-like receptors*, receptores Toll- like

T_m: Temperatura de melting

TNF- α : *Tumor necrosis factor- α* , factor de necrosis tumoral α

TPH: Transplante de progenitores hematopoyéticos

TTP: *Time-to-progression*, intervalo de tiempo desde el diagnóstico hasta el primer tratamiento

VCAM-1: *Vascular cell adhesion molecule-1*, molécula de adhesión vascular-1

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento endotelial vascular

VEGF-R: *Vascular endothelial growth factor receptor*, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

UV: Ultravioleta

I. INTRODUCCIÓN

1. Leucemia linfática crónica B

1.1 Generalidades

La Leucemia Linfocítica Crónica B (LLC-B) es un síndrome linfoproliferativo crónico incurable caracterizado por la proliferación y acúmulo progresivo de linfocitos B monoclonales en sangre periférica, médula ósea y tejidos. Ello conduce a un incremento de la cifra de linfocitos y a la aparición de adenopatías, esplenomegalia y citopenias como consecuencia de la infiltración masiva de la médula ósea. En esta neoplasia, los linfocitos neoplásicos son incapaces de cumplir su función inmunitaria, y presentan una supervivencia celular prolongada como consecuencia de la recepción de múltiples señales antiaoptóticas procedentes del microentorno celular. El sistema inmunitario, en el que los linfocitos cumplen una importante función, queda muy debilitado. La LLC-B es la neoplasia hematológica más frecuente del adulto en los países occidentales (1). En Estados Unidos la incidencia ajustada según la edad es de 4,2 casos por cada 100.000 habitantes y año, lo cual supone el diagnóstico de 16000 nuevos casos por año. Existe una marcada diferencia por sexos, ya que la incidencia en hombres (5,8 casos/año) casi duplica la incidencia en mujeres (3,0 casos/año) (2).

En Europa, la incidencia es muy similar (4.9 casos/año), y la distribución por sexos también: 5.9 casos/año para los hombres y 4.0 casos/año para las mujeres (3). Por otro lado, la incidencia de la enfermedad aumenta dramáticamente con la edad, de tal manera que es superior a 20 casos/100.00 hab/ año en las personas mayores de 70 años e incluso superior a 30 casos/100.000 hab/año en la población de más de 80 años (Figura 1.1). Por el contrario, la enfermedad es muy infrecuente en jóvenes (0,2 casos/año en menores de 40 años).

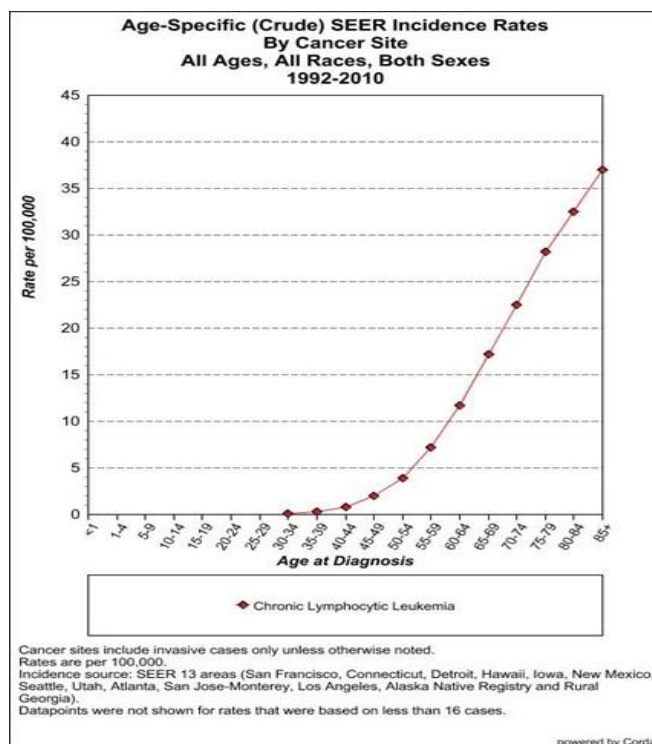


Figura 1.1 Incidencia de la leucemia linfática crónica en función de la edad. Datos de Estados Unidos de América (estudio SEER) (4) (2).

Una de las características epidemiológicas más llamativas de la LLC es su diversidad geográfica y racial (5). En este sentido, dentro de los Estados Unidos la incidencia en hombres (6,2 casos/año) y mujeres (3,2 casos/año) de raza caucásica es muy superior a la de los afroamericanos (4,3 y 2,0 casos/año para hombres y mujeres, respectivamente). En el extremo opuesto están los americanos de origen asiático y los habitantes de las islas del Pacífico (1,3 y 0,7 casos/año para hombres y mujeres, respectivamente). En los países del Extremo Oriente como Japón, la incidencia de la enfermedad es extremadamente rara (0,48 casos/año), siendo incluso inferior a la del linfoma de células del manto en dicho país. Dichas variaciones, probablemente no solo reflejan diferencias entre poblaciones, sino también variabilidad en la disponibilidad de los métodos diagnósticos (6). La LLC-B representa el 0.8% de todos los cánceres y el 25-30% de las leucemias en el adulto.

1.2 Diagnóstico

1.2.1 Presentación clínica

La edad mediana de los pacientes al diagnóstico es de 70 años en la mayoría de las series, siendo más frecuente en varones que en mujeres (7). Sin embargo, debido a la práctica creciente del análisis de forma rutinaria, la LLC-B se diagnostica cada vez con mayor frecuencia en personas relativamente jóvenes y en la fase asintomática de la enfermedad.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad se deben a la infiltración progresiva de la médula ósea, ganglios linfáticos y bazo (8) por las células leucémicas LLC (que morfológicamente se asemejan a linfocitos maduros de la sangre periférica), así como a las alteraciones inmunológicas que caracterizan a esta enfermedad (9). En la actualidad hasta un 80% de los pacientes se diagnostican de manera casual, en estadio inicial como consecuencia de la detección de una linfocitosis en el hemograma o la detección de una adenopatía. Más del 25% no presentan ningún tipo de sintomatología, y el síntoma más frecuente es la astenia y debilidad. Hasta un 20% de ellos pueden presentar síntomas B definidos como la pérdida de peso superior al 10% en 6 meses, sudoración nocturna, fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ durante más de 2 meses (en ausencia de infección) y astenia marcada (ECOG 2) que le impide realizar una actividad normal. Entre un 60-80% presentan adenopatías en el momento del diagnóstico, preferentemente a nivel cervical, supraclavicular o axilar; el 50% presentan esplenomegalia leve o moderada y en un 10-20% de los casos existe hepatomegalia. La infiltración de otros órganos no suele ser sintomática y se detecta de manera casual al realizar algún tipo de estudio histológico (o post-mortem). Así, se ha descrito afectación gastrointestinal, cutánea, pulmonar, renal, prostática y en SNC.

1.2.2 Morfología e inmunofenotipo

El diagnóstico de la LLC-B se basa en la realización de un hemograma, una extensión de sangre periférica y un estudio inmunofenotípico de la población linfocitaria.

Para el diagnóstico de LLC-B se requiere una cifra de linfocitos B clonales ≥ 5.000 linfocitos por μL en sangre periférica al menos durante 3 meses. Dicha población clonal se ha de confirmar mediante un estudio por citometría que confirme la restricción de cadenas ligeras kappa o Lambda en la misma (10). De forma rutinaria, también se analiza la presencia de mutaciones cromosómicas específicas de LLC-B mediante *FISH* (hibridación in situ fluorescente).

Los linfocitos B neoplásicos observados en la extensión de sangre periférica son de tamaño pequeño, cromatina madura, con unos acúmulos típico (*Grumele*) y escaso citoplasma (Figura 1.2). Estas células pueden ir acompañadas de otros linfocitos con mayor citoplasma, o núcleo hendido o prolinfocitos. La presencia de más de un 10% de estas células grandes o atípicas le confiere la denominada morfología “atípica” que en ocasiones va ligada a la presencia de determinadas alteraciones citogenéticas como la trisomía 12. Con frecuencia se observa la presencia de las denominadas “Sombras de *Gümprecht*” que corresponden a restos nucleares de células leucémicas rotas durante el proceso de extensión (11).

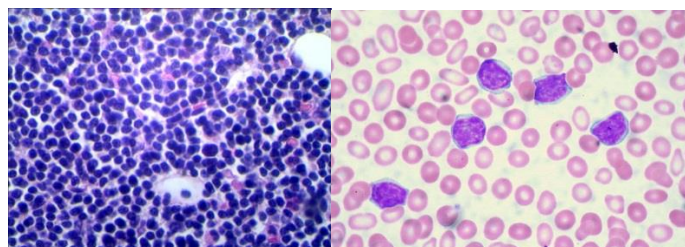


Figura 1.2 Aspirado de médula ósea y frotis de sangre periférica de un paciente con LLC-B.

A nivel de los ganglios linfáticos la arquitectura está alterada por la presencia de dicha celularidad linfoide que adopta un patrón pseudonodular, por la presencia de áreas más claras conocidas como los centros de proliferación, alternando con otras zonas más oscuras. La actividad mitótica es baja excepto en el centro de estas estructuras. A nivel del bazo la infiltración suele afectar a la pulpa blanca. La infiltración de la médula ósea

puede adoptar cuatro patrones bien identificados: nodular, intersticial, mixto o difuso. Los centros de proliferación presentes en la misma son menos abundantes que en los ganglios.

Las células de la LLC-B co-expresan antígenos de línea B (CD19, CD20, CD23) con el antígeno de línea T (CD5). El nivel de expresión de las inmunoglobulinas de superficie, del CD20 y del CD79b es débil en contraposición a los linfocitos B normales y a otros síndromes linfoproliferativos con expresión leucémica. El antígeno CD10 es negativo, así como el FMC7. La expresión de ciclina D1 es negativa. Existen algunos casos con un fenotipo atípico, con pérdida de CD5 ó CD23 ó elevada expresión de Ig de superficie o CD79b (Tabla 1.1).

Nivel de expresión de marcadores

Ausente	CD10, CD80, CD86, ciclinaD1
Débil	IgM, IgD, CD22, CD79b
Alta	CD5, CD19, CD20, CD23, CD27, CD40, CD43, CD79a
Variable	CD38, Zap70, $\alpha 4\beta 1$

Tabla 1.1 Diferente expresión de marcadores de diagnóstico en la LLC-B

El diagnóstico de Leucemia Linfática crónica se establece en base a la presencia de una cifra de linfocitos B clonales, con un fenotipo característico de LLC-B en sangre periférica durante más de 3 meses. No se requiere realización de técnicas de imagen ni de biopsia o aspirado medulares (10).

1.3 Sistemas de estadiaje

Los diferentes estadios de la LLC-B se clasifican según los criterios de Rai (12) y/o de Binet (13). Rai y colaboradores publicaron en 1975 una clasificación de la LLC-B en estadios clínicos, aportando un considerable impulso a los estudios clínicos y biológicos sobre la enfermedad desde una nueva perspectiva. En 1979, Binet presentó su

propio sistema de estadiaje en el congreso de *La Société Française d'Hématologie* en Paris. En 1981 Binet presentó dicho sistema de clasificación en el primer *I International Workshop on CLL (IWCLL)* en Paris que agrupó a investigadores de muy diversos campos particularmente interesados en la LLC y otros síndromes linfoproliferativos. Ese mismo año, y en una segunda reunión de dicho *workshop* se propuso una clasificación conjunta de ambos sistemas, que es el más recomendado en las principales guías internacionales de LLC-B.

Clasificación de Rai

Se fundamenta en que en la evolución de la enfermedad hay un progresivo acúmulo de linfocitos neoplásicos en la sangre y órganos linfoides primarios y secundarios. Como consecuencia de ello aparece una linfocitosis progresiva que se acompaña de la aparición de adenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia e infiltración de médula ósea. La infiltración extensa de la médula conduce al desarrollo de las citopenias presentes en las fases avanzadas de la enfermedad.

Clasificación de Binet

La base de la clasificación de Binet es el reconocimiento de una forma predominantemente esplénica de la enfermedad, la cual puede presentar un mejor pronóstico que en la clasificación de Rai, y del reconocimiento de que la presencia de anemia y/o trombocitopenia presentan un pronóstico similar y no requieren un estadio distinto.

	Estadio	Diagnóstico
Clasificación Rai	0	Linfocitosis en sangre periférica*
	I	Linfocitosis y adenopatías**
	II	Linfocitosis y hepato y/o esplenomegalia
	III	Linfocitosis y anemia***
	IV	Linfocitosis y trombopenia***

Clasificación Binet	A	<3 Regiones afectadas sin anemia
	B	>3 Regiones afectadas sin anemia
	C	Anemia y/o trombopenia

*Linfocitosis: más de 5000 linfocitos B clonales/ μ L (IWCLL 2008)

** Adenopatías, hepato y esplenomegalia detectables a la exploración física

*** Anemia: Hb < 11 g/dL

***Trombocitopenia: plaquetas < 100.000/ μ L

Tabla 1.2 Criterios de la clasificación de Rai y de Binet.

Las clasificaciones de Rai y Binet son útiles tanto para predecir el pronóstico de la LLC-B, como para el establecimiento de indicaciones terapéuticas, siendo los índices más utilizados en la práctica clínica para establecer el pronóstico. No obstante, dentro de cada estadio clínico existe una gran variabilidad que dificulta una adecuada predicción del curso individual de los pacientes. Debido a ello, recientemente se han definido ciertos factores pronósticos basados en estudios biológicos y moleculares que se abordarán en el apartado de factores pronóstico. Es importante reseñar que ambas clasificaciones se basan en la exploración física y en los resultados analíticos. Las guías internacionales (10) no recomiendan la realización de pruebas de imagen en la práctica clínica habitual.

Ambas clasificaciones fueron integradas en un clasificación combinada propuesta por el IWCLL (*International Workshop on CLL*) (14).

Se definen 3 estadios en la LLC-B, un estadio inicial de la enfermedad (Rai 0, Binet A), intermedio (Rai I/II, Binet B) y avanzado (Rai III/IV, Binet C) (Tabla 1.3). Ello se traduce en un descenso progresivo de la supervivencia (tabla 1.3).

Riesgo	Binet/Rai	Criterios clínicos	Supervivencia mediana (años)
inicial	A(0), A(I), A(II)	< 3 áreas linfoides afectas	10
Intermedio	B(I), B(II)	≥ 3 áreas linfoides afectas	5
Avanzado	C(III), C(IV)	Anemia o trombocitopenia (≥ linfadenopatías)	3

Tabla 1.3 Clasificación combinada de Rai/Binet

1.4 Factores pronóstico

El estadio clínico de la enfermedad es una de las variables pronósticas más utilizadas en la enfermedad, pero como ya hemos visto previamente, es incapaz de discriminar subgrupos de pacientes con distinto pronóstico dentro de un mismo estadio clínico. Así mismo, no tiene en cuenta el carácter inmune que algunas citopenias pueden presentar y que no presentan el mismo significado que las citopenias de origen infiltrativo. Por ello a lo largo de estas décadas ha habido un constante esfuerzo por identificar variables capaces de proporcionar información pronóstica adicional. Inicialmente se identificaron factores clínicos y analíticos, y más recientemente, la profundización en el conocimiento de la biología de la enfermedad ha contribuido a identificar variables biológicas, genéticas y moleculares con impacto pronóstico.

1.4.1 Factores pronóstico clásicos

Edad

Los estudios realizados sobre la influencia de la edad en la historia natural de la enfermedad, muestra que los pacientes jóvenes y los de edad avanzada presentan una mediana de supervivencia similar (10 años), pero la causa de muerte es diferente (15). Los pacientes jóvenes mueren a consecuencia de la LLC, mientras que algunos pacientes fallecen de otras causas, ya que la co-morbilidad que se presenta a edades avanzadas tiene

un impacto directo sobre la expectativa de vida y sobre la propia tolerancia al tratamiento (16).

Patrón de infiltración medular

El valor pronóstico de la infiltración medular ha sido evaluado por diversos autores con resultados, en ocasiones discordantes. El patrón de infiltración difuso de la biopsia medular versus el resto, se correlaciona con el estadio clínico, la progresión tumoral y la supervivencia en algunos estudios (17) (18, 19). Los estudios que lo identificaban se realizaron en la era de los agentes alquilantes, su impacto en épocas más recientes con los tratamientos intensivos parece no ser relevante.

Tiempo de duplicación linfocitaria (TDL)

Hace referencia al intervalo de tiempo necesario para duplicar la cifra de linfocitos. Es un parámetro fácil de calcular, y que presenta un claro valor pronóstico respecto al tiempo al inicio de tratamiento en el estadio A de Binet. Así, los pacientes con un TDL inferior a 12 meses presentan un tiempo al tratamiento de 20 meses frente a los 72 meses del resto (20). Un TDL inferior a 6 meses, o un aumento del 50% en menos de 2 meses han sido incorporados como criterio para iniciar un tratamiento (10).

Lactato deshidrogenasa (LDH)

Es un parámetro que refleja el grado de recambio celular en la mayoría de los síndromes linfoproliferativos. En la LLC-B la elevación de la LDH se asocia a otros factores de pronóstico adverso como la expresión de CD38 y ZAP-70 (21) y presenta un valor pronóstico independiente.

β 2-microglobulina

Es una proteína transmembrana asociada al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (HLA-1). Sus niveles séricos elevados se asocian a otros factores de mal pronóstico, como CD38 y ZAP-70 (22) Dicho parámetro es un factor predictivo de respuesta (23) y recientemente se ha incorporado como variable con peso

pronóstico independiente en un nuevo score de riesgo de la enfermedad (24) en la era de la quimio-inmunoterapia.

Timidina quinasa (TK)

La TK es una enzima que participa en la síntesis, por tanto en la capacidad proliferativa de la célula. Los niveles séricos elevados de TK se han asociado a enfermedad avanzada (25) y recientemente se ha identificado el valor pronóstico independiente de dicho parámetro, incluyendo en el análisis el estado mutacional de IgVH, con incorporación del mismo a un índice pronóstico (24).

1.4.2 Nuevos factores pronóstico

Expresión de ZAP-70

La proteína ZAP-70 (*zeta chain associated protein kinase 70 kDa*) es un miembro de la familia tirosin quinasa Sky-ZAP-70, que normalmente se expresan en los linfocitos T y en las células NK, pero no se expresa en los linfocitos B normales en condiciones fisiológicas. Su función es favorecer la señalización inicial del receptor de las células (TCR). Los estudios iniciales de perfil génico de expresión de la LLC-B, mostraron que la expresión de dicha proteína se asociaba a la formas no mutadas de la enfermedad (26). La expresión de dicha proteína detectada por citometría de flujo (CMF) en más del 20% de las células neoplásicas, se asocia estadios clínicos avanzados, niveles elevados de LDH y extensa infiltración medular. Constituye un factor pronóstico de progresión a estadios avanzados y a una peor supervivencia en la mayoría de las series (27) (28).

Expresión de CD38

El CD38 es una glicoproteína de membrana tipo II que se describió originalmente como un marcador de activación celular, cuya expresión variaba en función del grado de diferenciación celular tanto en los linfocitos B como T. Actúa como enzima y como receptor de membrana. La unión a su ligando CD31 genera señales de activación y diferenciación B y T (29). Asimismo, interviene en la regulación de los niveles

intracelulares de calcio a través de la producción de ADP y NAADP (30). La expresión de CD38 en más del 20% de las células de LLC-B se ha considerado un marcador de las formas no mutadas de LLC-B (31), aunque su expresión puede variar a lo largo de la enfermedad. Su expresión elevada presenta un valor pronóstico independiente, pero su reproductibilidad en los diversos estudios es limitada (32).

Expresión de CD49d/CD29

CD49d/CD29 ($\alpha 4\beta 1$) es una molécula de superficie perteneciente a la familia de $\beta 1$ -integrinas, también conocida como VLA-4 (*very late antigen 4*). Dicha molécula favorece la entrada de los linfocitos B en los ganglios linfáticos a través de la unión a su ligando VCAM-1 (33). Así mismo, la unión a sus ligandos, VCAM-1 ó fibronectina, genera una señal de supervivencia celular y es capaz de inducir quimiorresistencia a diversos agentes quimioterápicos *in vitro* (34). En la LLC-B dicha molécula, favorece la migración del linfocito B neoplásico junto al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) a través del endotelio (35). La expresión de CD49d se asocia a formas avanzadas de la enfermedad, y constituye un factor pronóstico independiente en la mayoría de las series (36).

Estado mutacional de la región variable del gen de las inmunoglobulinas

Tal y como se ha descrito en el origen celular, la presencia de mutaciones en la región variable del gen de las inmunoglobulinas, identifica un linfocito B neoplásico que ha experimentado una reacción centro-germinal, y por tanto ha sido sometido a una estimulación antigénica vía T-dependiente. En la LLC-B la presencia o ausencia de dichas mutaciones (37) identifica dos grandes grupos con un pronóstico claramente diferente: las formas mutadas se caracterizan por presentar una homología con el gen en forma germinal inferior al 98% y que se corresponde con un comportamiento más indolente de la enfermedad, la presencia de la delección 13q y con una supervivencia prolongada. Las formas no mutadas se caracterizan por una homología de la secuencia superior al 98%, y corresponde a formas más agresivas de la enfermedad, con incidencia mayor en varones y asociación a otros factores pronósticos adversos como la expresión de ZAP-70, CD38,

alteraciones citogenéticas de riesgo, diferente capacidad de señalización del receptor de células B (BCR) y menor longitud de los telómeros (38-42). Dada la dificultad técnica que supone la secuenciación de IgVH, se han propuesto diversos marcadores “sustitutivos” del estado mutacional, como CD38 y ZAP-70, si bien el índice de concordancia no es del 100%. La razón por la cual el estado mutacional IgVH influye en el comportamiento biológico no es bien conocida, aunque la capacidad de señalización del BCR es diferente en ambos subgrupos (43). Algunas formas mutadas de la enfermedad presentan un comportamiento más agresivo, como la familia V3-21 (44).

Alteraciones citogenéticas

El impacto de la citogenética en la LLC-B es conocido desde hace más de 20 años. Así, por técnicas convencionales, con un nivel de sensibilidad (40-50%) de la presencia de determinadas alteraciones citogenéticas o de un cariotipo complejo se ha asociado a características desfavorables de la enfermedad y a un peor pronóstico (45) (46) (47, 48). La introducción de las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente” (*FISH*) ha permitido mejorar la sensibilidad de las técnicas de citogenética convencional, siendo posible la identificación de alteraciones numéricas o estructurales hasta en el 80% de los casos. Algunas de estas alteraciones han mostrado un claro impacto pronóstico en la evolución de la enfermedad. A continuación describiremos las más frecuentes en base a estudios con *FISH*.

Delección 13q14.3

Alteración citogenética estructural más frecuente en la LLC-B, presente hasta en el 50% de los pacientes. Diversos genes residentes en dicha región han sido propuestos como genes relevantes en la patogenia de la enfermedad, pero no ha identificado un gen aislado que sea responsable etiopatogénico único. La presencia de la delección 13q14.3 se asocia a una supervivencia prolongada y por tanto a un pronóstico favorable; si bien la delección homocigota de la región parece asociarse a una evolución más desfavorable (47).

Delección 11q 22-q23

Se identifica la pérdida de dicha región en un 5-20% de los pacientes. La presencia de la del 11q 22-q23 se asocia a la presencia de grandes adenopatías, estadios avanzados de la enfermedad y un intervalo libre a la progresión menor que el cariotipo normal o la trisomía 12 (49). En la región mínimamente delecionada se encuentra el gen de la ataxia-telangiectasia (ATM), reconocido gen supresor implicado en la reparación del ADN. El alelo restante se encuentra mutado en una proporción variable, por tanto, se considera una alteración genética secundaria. Se asocia a un pronóstico desfavorable en términos de supervivencia con la mayoría de los tratamientos convencionales (47) y a una duración inferior de la respuesta con los esquemas de quimio-inmunoterapia (24).

Trisomía 12

Alteración numérica presente en un 10-20% de los casos en Europa, alcanzando hasta un 30% en la serie americana (50). Su presencia se asocia a una morfología y fenotipo atípicos (51). Aunque inicialmente se comunicó un impacto pronóstico negativo en la supervivencia, estudios más recientes con series más amplias muestran un pronóstico intermedio entre la presencia de la deleción 11q22 y la deleción 13q14 (47).

Deleción 17p13

La deleción del brazo corto del cromosoma 17 se encuentra en un 4-8% de las LLC-B de nuevo diagnóstico, pero su frecuencia se eleva hasta un 20-30% en las formas avanzadas de la enfermedad. En esta región se encuentra situado el gen supresor p53, y su pérdida se asocia a una ausencia de respuesta a los agentes alquilantes o los análogos de las purinas. En los pacientes con deleción 17p el alelo remanente se encuentra mutado en un 75% de los casos, mientras que en ausencia de deleción la presencia de mutaciones es de un 5-10%. La supervivencia libre de progresión (SLP) de los pacientes con deleción 17p13 o mutación de p53 es similar, y por tanto implica un pronóstico desfavorable (47). La presencia de deleción/mutación de p53 se asocia a una quimiorresistencia a agentes alquilantes, análogos de purinas e inmuno-quimioterapia, con una supervivencia global (SG) mediana inferior a 2-3años (52). Diversas series han identificado su valor pronóstico independiente de otros factores para la SLP y la SG. Los nuevos inhibidores de tirosín-

quinasa de Bruton (Ibrutinib) y de la subunidad δ de PI3K son capaces de prolongar significativamente la SLP y la SG (53).

Otras alteraciones citogenéticas

La delección 6q15 y 6q23 se encuentran en un 6% de los pacientes con LLC-B, en general se asocian a formas avanzadas de la enfermedad, morfología atípica y elevada expresión de CD38. Se le considera una alteración de pronóstico intermedio (54). Por su parte, los reordenamiento del gen de las cadenas pesadas de las Ig con 18q21 o 19q13 afectan al 5% y suelen tener un impacto negativo en la supervivencia.

Mutaciones génicas puntuales

El desarrollo de las nuevas técnicas de secuenciación masiva (*Next generation sequencing*) está descubriendo la complejidad genética y la heterogeneidad de la enfermedad. La secuenciación del exoma completo de los pacientes con LLC ha permitido identificar diversas mutaciones previamente no conocidas, algunas de las cuales se comportan como “iniciadores” (*drivers*) y otras aparecen en el curso avanzado de la enfermedad. Las mutaciones detectadas se agrupan fundamentalmente alrededor de diversas vías de señalización: la señalización mediada por *NOTCH1*, las mutaciones que afectan a la maquinaria de *splicing*, procesado y transporte del ARN, la respuesta al daño del ADN y control de ciclo celular, la señalización mediada por WNT, la señalización mediada por BCR y la modificación en la cromatina. La progresiva reducción de costes de esta tecnología, ha permitido su aplicación a largas series de pacientes con LLC-B (55), con la consiguiente identificación del impacto pronóstico de algunas de ellas que pasaremos a describir.

NOTCH1

NOTCH1 es una proteína transmembrana codificada en el cromosoma 9q34.3 El papel oncogénico de NOTCH1 en la línea linfocitoide T ha sido ampliamente establecido, en especial en la Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL-T). Las mutaciones de NOTCH1 están presentes en el 56% de las LAL-T y se agrupan alrededor de dos regiones

“calientes” en el dominio HD, en el cual condicionan una activación constitutiva del complejo independiente de la unión a su ligando y el dominio PEST, en el cual incrementan la estabilidad de ICN1 (56). Las mutaciones de NOTCH1 se encuentran en un 10% de los pacientes al diagnóstico pero dicha frecuencia se incrementa hasta un 25% en fases avanzadas. La presencia de estas mutaciones se asocia un pronóstico negativo en términos de supervivencia y un mayor riesgo de transformación a Síndrome de Richter (57, 58).

SF3B1

SF3B1 codifica una subunidad del centro catalítico de la maquinaria de splicing del ARN localizado en el cromosoma 2q33.1. Estas mutaciones se detectan hasta en un 10% de los pacientes al diagnóstico, y su frecuencia se incrementa a un 18-25% en pacientes refractarios. Las mutaciones de SF3B1 son mutuamente excluyentes con MYD88, NOTCH1 y p53 (59). Su presencia se asocia a refractariedad a Fludarabina, estadios avanzados, formas no mutadas y delección de 11q (60).

MYD88

Las mutaciones en este gen se sitúan en el dominio de unión al receptor de la IL-1 (*toll-like receptor*). La presencia de esta mutación se ha descrito en una elevada frecuencia en otras neoplasias linfoides B, con la Macroglobulinemia de Waldenström o el linfoma difuso de células grandes B. En la LLC-B, la presencia de esta mutación se asocia a factores pronósticos favorables, como las formas mutadas, ausencia de expresión de CD38 o ZAP-70 y un curso clínico favorable en términos de supervivencia (61).

BIRC3

BIRC3 se encuentra situado en la región 11q22 y codifica una proteína que inhibe la cascada de señalización de NF-κB. Se identifica la presencia de mutaciones de BIRC3 en un 2.5% de los pacientes al diagnóstico, pero la frecuencia se eleva en casos de quimiorresistencia a fludarabina (62). Su presencia también se asocia a factores adversos de la enfermedad: formas no mutadas, presencia de delección 11q23 y estadios avanzados.

1.4.3 Evolución clonal

Las técnicas de secuenciación masiva (NGS) han permitido profundizar en el concepto de evolución clonal ligada en general a la presencia de diversas poblaciones clonales intratumorales que compiten entre sí en el desarrollo tumoral, y que con frecuencia se ven seleccionadas por la presión ejercida por los tratamientos aplicados. Dicha evolución clonal parece ser la responsable de las recaídas y la aparición de quimiorresistencias. En la LLC-B los estudios de *FISH* iniciales ya apoyaban dicha posibilidad, pero estudios recientes en LLC con NGS muestran que la presencia de determinadas subclones tumorales (p53 o SF3B1) al inicio del tratamiento predicen una menor SLP tras diversos esquemas terapéuticos (63). Ello sugiere la existencia de un proceso de selección clonal establecido por el propio tratamiento (64).

1.5 Tratamiento

1.5.1 Criterios de inicio de tratamiento

El diagnóstico de LLC-B no implica necesariamente la aplicación de un tratamiento inmediato. De hecho un 85% de los pacientes se diagnostican en fases iniciales de la enfermedad (A 0) y su supervivencia es comparable a la de su grupo de edad y sexo. En los años 80, se desarrollaron diversos ensayos en estadios iniciales que comparaban la aplicación de un tratamiento precoz con alquilantes versus un tratamiento diferido en los pacientes en estadio inicial (65). El metanálisis realizado por el grupo de trabajo mostró que la supervivencia era similar en ambos grupos, con una mayor incidencia de segundos tumores asociado al tratamiento con alquilantes (66). Ello condujo al establecimiento de una serie de criterios de “actividad de la enfermedad” reconocidos por las guías internacionales, cuya presencia condiciona la aplicación de un tratamiento (Tabla 1.4).

Variable
Fallo medular progresivo manifestado por desarrollo o empeoramiento de anemia o trombopenia
Esplenomegalia progresiva o masiva (>6 cm por debajo del reborde costal)
Adenopatías de gran tamaño (>10 cm) o de crecimiento progresivo
Tiempo de duplicación linfocitario <6 meses o incremento de la linfocitosis >50% en 2 meses
Anemia y/o trombopenia autoinmunes que no responden al tratamiento inmunosupresor
Pérdida de peso (>10% en 6 meses), astenia (ECOG>2), fiebre>38°C (sin infección durante >2 semanas) o sudoración nocturna (>1 mes)

Hallek M 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.

Tabla 1.4 Criterios de tratamiento.

La leucocitosis y la hipogammaglobulinemia, si no van acompañadas de otros datos de actividad de la enfermedad, no son por sí mismas criterios para iniciar el tratamiento. A su vez, la existencia de anemia hemolítica autoinmune no justifica el empleo de quimioterapia a no ser que la misma no responda a los corticoesteroides. No obstante, una parte de los pacientes que debutan en estadios iniciales y poseen datos de mal pronóstico van a desarrollar signos de progresión de la enfermedad, y es importante reconocerlos precozmente ya que constituyen una población candidata a la inclusión en ensayos clínicos que intenten explorar el beneficio de un tratamiento precoz en un grupo concreto de pacientes.

1.5.2 Tipos de tratamiento

En los últimos años, el tratamiento de la LLC ha sufrido múltiples cambios. El Clorambucilo ha sido el tratamiento estándar durante más de tres décadas. La incorporación progresiva de nuevos fármacos como los análogos de purina y su combinación con los AcMos, han permitido incrementar la tasa de respuestas y la calidad de las mismas, prolongando de manera significativa la supervivencia de los pacientes. A

pesar de ello, la LLC-B sigue siendo una enfermedad incurable con tendencia a la recaída continua que conduce finalmente a la muerte por progresión de la enfermedad. A la hora de establecer la estrategia terapéutica de los pacientes tendremos que tener en cuenta e integrar diversos aspectos: a) factores biológicos dependientes de la enfermedad, como la presencia de alteraciones genéticas específicas, como la presencia de delección/mutación de p53; b) factores dependientes del paciente como la edad y co-morbilidades que puedan limitar o impedir la aplicación de tratamientos intensivos; c) factores ligados al propio esquema terapéutico. Finalmente, para un pequeño subgrupo de pacientes jóvenes con enfermedad agresiva, se deberá considerar la posibilidad de la realización de un trasplante alogénico, única herramienta que consigue eliminar definitivamente la enfermedad en un pequeño subgrupo de pacientes. A continuación se detallan los principales tipos de tratamiento.

1.5.2.1 Quimioterapia

Durante décadas la monoterapia con agentes alquilantes, en concreto el clorambucil, ha constituido la principal herramienta terapéutica de la enfermedad. Su administración oral y su buena tolerancia facilitaban su aplicación a una población en general de edad avanzada y con co-morbilidades. No obstante, la eficacia del fármaco es limitada, con un 55-60% de respuestas globales (RG), una tasa de respuestas completas (RC) prácticamente inexistente y la posibilidad de generar segundas neoplasias por su carácter de agente alquilante.

En los años 80 se introdujeron los análogos de las purinas, constituidos por la Fludarabina (F), la Cladibrina (2-CDA) y la Deoxicoformicina (P, Pentostatina). La F ha sido el agente más desarrollado en la LLC-B y constituye la base del tratamiento actual de los pacientes sin co-morbilidad (67). La F como agente único permite obtener una tasa de respuestas superiores a los tratamientos quimioterápicos convencionales, como CHOP y CAP, con obtención de un 5-20% de RC (68). No obstante, esto no se traduce en un aumento significativo de la supervivencia.

La Bendamustina es un agente quimioterápico que comparte propiedades de los agentes alquilantes y de los análogos de las purinas, con una notable actividad como agente único. Su comparación directa con el Clorambucil en un estudio aleatorizado mostró una tasa superior de respuestas, sin diferencias en la supervivencia (69).

Con el fin de mejorar la eficacia de la Fludarabina, posteriormente se asoció a agentes alquilantes, en especial la Ciclofosfamida. La combinación de ambas (FC) ha sido comparada con F en 3 grandes estudios aleatorizados (70-72). Esta combinación, permite obtener una tasa de respuestas del 74% al 94%, significativamente superior a la fludarabina sola, con una SLP de 32 a 48 meses. Posteriormente, al esquema FC se asoció mitoxantrone (FCM), con una notable actividad del esquema, aunque no ha sido comparado de manera aleatorizada con FC. Dichos esquemas consiguieron, por primera vez, obtener tasa de RC con enfermedad mínima residual negativa (73).

La 2-CDA también ha sido utilizada en el tratamiento de la LLC-B y evaluada en un ensayo fase 3 frente a la combinación de 2-CDA a Ciclofosfamida (CFM) y Mitoxantrone (M).

1.5.2.2 Inmunoterapia

En los años 90 se introduce en el armamentario terapéutico los anticuerpos monoclonales dirigidos contra diversos antígenos de membrana de la células neoplásicas, los cuales muestran actividad anti-tumoral en LLC-B.

Rituximab

Es una inmunoglobulina IgG1 capaz de reconocer el antígeno CD20 presente en la superficie del linfocitos B a lo largo del 90% de su fase de diferenciación. El CD20 se cree que actúa como un canal regulador del calcio intracelular. Rituximab al unirse al CD20, es capaz de inducir la muerte celular por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*) y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) (74). Desde su introducción en 1998 se ha incorporado al tratamiento de la mayoría de los síndromes

linfoproliferativos B, entre ellos la LLC-B. Su actividad como agente único en LLC-B es moderada, excepto a dosis muy elevadas, sin embargo, su asociación a esquemas de quimioterapia ha permitido incrementar significativamente la eficacia de los mismos.

Alemtuzumab

Anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD52, presente en la superficie de los linfocitos B y T. Es un agente activo en monoterapia en LLC-B refractaria, especialmente en los pacientes con delección 17p (75). Es profundamente inmunosupresor y se asocia a una tasa elevada de infecciones, lo cual ha limitado considerablemente su uso. Su comparación directa con Clorambucil como tratamiento de primera línea en LLC demostró que Alemtuzumab obtenía una tasa significativamente superior de RG, RC y de SG (RG 83% vs 56%, RC 24% vs 2%) (76).

Ofatumomab

Es un anticuerpo anti-CD20 dirigido contra otro epítipo del antígeno CD20, con una mayor afinidad por el CD20 que conduce a un incremento en la citotoxicidad ligada al complemento. Las agencias americana (FDA) y europea (EMA) aprobaron su indicación en la LLC-B refractaria a Alemtuzumab/Fludarabina o a Fludarabina con masas adenopáticas superiores a 5 cm. Esta decisión se fundamentó en el análisis de 201 pacientes con dichas características, y la tasa de respuestas fue de 51% para los dobles refractarios y del 44% para los resistente a Fludarabina con grandes adenopatías (77).

Obinutuzumab (GA-101)

Anticuerpo IgG tipo II humanizado y glicosilado dirigido contra el antígeno CD20, cuya modificación postraducciona l conduce a un incremento en la apoptosis directa inducida por el mismo y la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (78). Un ensayo fase I/II ha mostrado que la dosis de 1000 mg permite obtener de un 30 a un 62% de respuestas, con una mayor frecuencia de reacción infusional y mayor frecuencia de neutropenias grado 3/4 sin que se acompañe de incremento en el riesgo de infección (79). Ello ha dado pie a la combinación con agentes quimioterápicos.

1.5.2.3 Quimioinmunoterapia

Combinaciones con rituximab

La combinación más utilizada ha sido rituximab en asociación a fludarabina y ciclofosfamida. El primer ensayo prospectivo fase II realizado en 300 pacientes mostró una elevada actividad del esquema, con una tasa de RG del 95% y de RC 72%, con un intervalo libre de progresión (ILP) de 80 meses (80). Ésto condujo a la realización de un gran ensayo aleatorizado en el que se incluyeron 817 pacientes aleatorizados a recibir FCR vs FC. La tasa de RG y RC fue significativamente superior en la rama de FCR frente a la de FC (93 vs 85% y 44% vs 23%, respectivamente, $p < 0.001$). La SLP a 2 años fue de 77% para FCR frente a 62% en el grupo de FC. La adición de rituximab a FC se asoció a una mayor frecuencia de neutropenia grado 3-4 (34% vs 21%) sin que ello se asociara a un incremento en la mortalidad relacionada con el tratamiento (81). Resultados similares se obtuvieron en un ensayo realizado en pacientes con LLC-B refractarios o en recaída (82).

Dado que la LLC-B incide en población de edad avanzada se diseñó un ensayo clínico con FCR a dosis reducidas de fludarabina (20 mg/m²) y ciclofosfamida (150 mgr/m²) durante 6 ciclos seguidos de mantenimiento con rituximab (500 mgr/m² cada 3 meses) hasta progresión. La tasa de RG fue del 10% y de RC del 77%. Ello se asoció a una reducción en la tasa de neutropenia a 3-4 (13%). La adición de Alemtuzumab a FCR ha sido aplicada a pacientes menores de 60 años y elevadísimo riesgo (del 17p) con obtención de una tasa de RG 92% y un 70% de RC. En el subgrupo de pacientes con del17p la tasa de RC fue del 57%, por tanto este régimen se configura como un esquema efectivo para inducir respuesta previo a la realización un trasplante alogénico (83). La combinación de rituximab con otros análogos de purinas, en concreto pentostatina y ciclofosfamida no demostró ventajas en tasa de respuestas o SG frente a FCR en un ensayo fase III (84).

La bendamustina ha sido combinada con rituximab (BR) tanto en fases avanzadas de la enfermedad como en primera línea (85-87). Un ensayo fase II en 81 pacientes en

recaída mostró una tasa de RG del 54% con un 9% de RC. Un 46% de los pacientes con LLC-B refractarias respondieron a dicho esquema. La mediana de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue de 14.7 meses (85). Dicho régimen ha sido testado en una fase II en primera línea con 117 pacientes con una tasa de RG del 88% y un 23% de RC. La tasa de neutropenia e infección grado 3-4 fueron inferiores a los datos obtenidos con FCR (86). Estos resultados dieron pie al diseño comparativo directo de ambos esquemas (FCR frente a BR) en 565 pacientes sin co-morbilidad previamente no tratados (CLL10) (87). La tasa de RG fue similar en ambos grupos (98%) con una mayor tasa de RC con Enfermedad Mínima Residual (EMR) negativa en el grupo de FCR frente a BR (74% vs 63%, $p=0.024$). La mediana de SLP fue de 54 vs 43 meses, respectivamente ($p < 0.001$). La frecuencia de neutropenia severa fue significativamente superior para FCR vs BR (88% vs 68%, $p < 0.001$), con mayor incidencia de infecciones severas (39.8 vs 25%). En consecuencia, FCR sigue siendo el tratamiento estándar en pacientes jóvenes sin co-morbilidad porque ofrece una mayor calidad de la respuesta, pero a expensas de una mayor toxicidad. Los pacientes de edad superior a 65 años se pueden beneficiar de BR como un régimen alternativo eficaz.

Combinaciones con Alemtuzumab

Dicho anticuerpo ha sido combinado con FC (FCA) o con fludarabina (FA) en dos ensayos aleatorizados fases III (85, 88). El ensayo del grupo francés comparaba la eficacia de FCA frente a FCR en pacientes jóvenes sin co-morbilidad y tuvo que ser cerrado prematuramente por la mortalidad ligada al tratamiento con FCA. Asimismo, la eficacia de FCR fue claramente superior a FCA. En el segundo ensayo el esquema FA se comparó con F en el tratamiento de LLC-B refractaria o en recaída. FA se asoció a una mayor SLP que F (23.7 vs 16.5 meses, $p=0.0003$) y mayor SG (no alcanzada vs 52.9 meses) a expensas de una mayor morbilidad infecciosa y hematológica.

Combinaciones con ofatumomab

La combinación de ofatumomab y clorambucil ha sido evaluada en un ensayo fase III con 447 pacientes diagnosticados de LLC-B previamente no tratada no candidatos a

recibir fludarabina (66). La combinación de ClO se asoció a una mayor tasa de RG (82% vs 69%, $p=0.001$), RC (12% vs 1%) y mayor SLP (22.4 vs 13 meses) que Cl. La tasa de infecciones grado 3-4 y efectos adversos grado 3-4 fue similar en ambos grupos. En conclusión, la asociación de Cl a O tiene una actividad relevante en LLC-B no candidatos a fludarabina y ha sido aprobada como opción terapéutica inicial en este grupo de pacientes.

Combinaciones con obinutuzumab

La combinación de obinutuzumab con clorambucil ha sido evaluada en un ensayo clínico prospectivo realizado por el GCLLSG en una serie de 781 pacientes con LLC-B previamente no tratados, con un grado de co-morbilidad marcado evaluado por la escala CIRS (>6) o aclaramiento de creatinina inferior a < 70 mL/min. Los pacientes fueron aleatorizados a recibir CL vs CL-Ob vs CL-R. Los dos esquemas de quimioinmunoterapia obtuvieron una tasa de RG y una SLP significativamente superior a CL en monoterapia. Así mismo, la rama CL-Ob mostró una tasa de RC y una SLP significativamente superior a CL-R (*hazard ratio* 0.39; IC 95% 0.31-0.49; 20.7% vs 7%, respectivamente). Las reacciones infusionales durante la administración de AcMos fueron superiores en la rama CL-Ob pero ello no se acompañó de mayor tasa de infecciones. Estos resultados han consolidado a CL-Ob como una opción terapéutica efectiva en LLC-B en pacientes con co-morbilidad (89).

1.5.2.4 Nuevos agentes terapéuticos

Inhibidores de tirosín quinasas de la ruta del receptor de la célula B

El receptor de la célula B, se configura como una molécula de superficie con un papel clave en la etiopatogenia y progresión de la LLC-B. En los últimos 5 años se han diseñado diversos inhibidores dirigidos a la cascada de señalización de BCR que se detallan a continuación.

Fostamanib

La proteína Sky es una tirosín quinasa (TK) encargada de transferir la señal desencadenada por BCR, y su activación se traduce una inhibición de la apoptosis a través de la activación directa de PI3K/AKT. Su expresión está aumentada en LLC-B. Fostamanib es un inhibidor oral de Sky capaz de bloquear su señalización y desencadenar apoptosis. Dicha molécula ha sido evaluada en un ensayo fase I/II con diversas neoplasias linfoides refractarias, con una notable actividad en LLC-B, con un 54% de RG, todas ellas RP. La mediana de SLP fue de 6.4 meses. La toxicidad limitante de dosis fue la neutropenia, trombopenia y la diarrea. Dicho fármaco ha tenido un desarrollo limitado en LLC-B y se ha centrado en artritis reumatoide, pero existen nuevos inhibidores de Sky con notable actividad en LLC-B que empiezan a ser evaluados en ensayos fase II, como el Entospletinib (90).

Dasatinib

Inhibidor de las quinasa Src y Abl, diseñado como un inhibidor de 2ª generación para la Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Estudios *in vitro* mostraron que dicho agente era capaz de inducir apoptosis en células de LLC-B y además potenciaba los efectos anti-apoptóticos de los fármacos clásicos como F, B o CL. Un estudio fase II realizado en 15 pacientes con LLC-B R/R mostró que dasatinib era capaz de reducir el tamaño ganglionar en 9 pacientes con una menor efectividad sobre la enfermedad en sangre periférica (91).

Ibrutinib

La tirosín quinasa de Bruton (BTK) es una proteína citoplásmica, que tras la estimulación de BCR es rápidamente fosforilada por Sky o Lyn, y una vez activada se encarga de amplificar la señal de BCR, lo cual se traduce en una activación de NF- κ B, así como señales de proliferación y diferenciación. Asimismo, BTK está implicada en la regulación de la señalización derivada de integrinas y de la vía CXCR4/CXCR5.

Ibrutinib (PCI 32765) es un inhibidor oral irreversible de BTK capaz de inducir apoptosis en la LLC-B y otros linfomas B. Los modelos preclínicos muestran que

Ibrutinib es capaz de revertir los efectos protectores de CD40L, BAFF, TNF, IL-4 y de la estimulación BCR. A su vez, inhibe la proliferación de las células de LLC-B, la quimiotaxis hacia CXCL12/13, la adhesión mediada por integrinas y la producción de quimiocinas CCL3 y CCL4 por parte del linfocito B neoplásico. Todo ello se traduce en una ruptura de múltiples interacciones de la célula de LLC con su microentorno celular, y por tanto una disminución en las señales anti-apoptóticas que recibe del mismo. Todo ello se traduce en una salida de los linfocitos tumorales desde los ganglios y otros tejidos hacia el torrente sanguíneo donde mueren parcialmente por apoptosis. Este mecanismo de acción es el responsable del fenómeno de linfocitosis asociada a una reducción del tamaño ganglionar que se produce a los días de estar recibiendo el fármaco. Un ensayo fase I/II realizado en 85 pacientes con LLC-B R/R con dos niveles diferentes de dosis mostró que este agente obtenía un 71% de RG con un 20% adicional de respuesta parcial ganglionar con linfocitosis. La tasa de respuesta fue similar para ambas dosis (420 y 840 mg) e independiente de factores de mal pronóstico reconocidos, como la delección de 17p, número de líneas previas, y niveles de β 2microglobulina. La SLP y la SG a los 26 meses fue de 75% y 83% respectivamente, lo que arroja un resultado significativamente superior al obtenido con otras terapias en estas circunstancias. Se han descrito mutaciones adquiridas en 6 pacientes que mostraron resistencia a Ibrutinib. La mutación C481S afecta al sitio de unión de BTK con Ibrutinib y se traduce en una inhibición reversible de BTK. Las mutaciones R665W y L845F en PLC gamma conducen a una ganancia de función que se traduce en una señalización autónoma de BCR.

Recientemente, Ibrutinib ha demostrado una clara superioridad frente a ofatumomab en un ensayo clínico fase III en 391 pacientes con LLC-B R/R (92). La tasa de RG para Ibrutinib vs Ofatumomab a los 12 meses fue de 42,6% vs. 4,1%, ($P < 0.001$), con una mediana de SLP no alcanzada (88% a los 6 meses) frente a 8,1 meses, respectivamente. Ello ha conducido a su aprobación como tratamiento de rescate en LLC-B R/R. Ibrutinib también está siendo evaluado en combinación con rituximab, ofatumomab y BR con resultados muy prometedores (93, 94).

Idelalisib

Las quinasas fosfatidilinositol 3 (PI3K) juegan un papel fundamental en la oncogénesis por su papel regulador de la supervivencia celular. La expresión de la subunidad δ está restringida al sistema hematopoyético y juega un papel clave en la proliferación y supervivencia de los linfocitos B. Idelalisib o CAL-101 es un inhibidor oral selectivo de dicha subunidad, capaz de inducir apoptosis en células primarias de LLC con carácter dosis y tiempo dependiente sin afectar a los linfocitos T, células NK o la ADCC. Idelalisib inhibe la quimiotaxis de la LLC hacia CXCL12 y CXCL13 así como la secreción de citocinas por parte de las células de LLC en co-cultivos. Idelalisib fue evaluado inicialmente en un ensayo fase I con 54 pacientes con LLC-B R/R con características clínicas muy adversas (mediana 5 líneas previas, grandes adenopatías en >80%) la toxicidad grado ≥ 3 fue la neumonía (20%), la neutropenia febril (11%), y la diarrea (6%). Idelalisib fue capaz de reducir el tamaño ganglionar en el 81% de los pacientes, con una tasa de RG del 72%, un 39% de RP y un 33% de RP con linfocitosis. La mediana de SLP fue de 15,8 meses.

La combinación de idelalisib y rituximab ha sido evaluada en un ensayo fase III frente a rituximab/placebo en 220 pacientes con LLC-B R/R a una dosis de 150 mg/2 veces al día (95). Los pacientes que recibieron idelalisib y rituximab presentaron una tasa de RG significativamente superior a rituximab/placebo (81% vs. 13%; *odds ratio*, 29.92; $P < 0.001$) y una mayor SG (92% vs 80%; *hazard ratio* para exitus 0,28; $P = 0,02$). Idelalisib presenta una toxicidad gastrointestinal de grado 3-4 superior al 10%. Existen numerosos estudios actuales en marcha en combinación con bendamustina/rituximab fludarabina o clorambucil.

Inhibidores de Bcl-2

Bcl-2 es una proteína que inhibe la apoptosis por la vía intrínseca mitocondrial y que se encuentra sobreexpresada en LLC-B. La primera generación de inhibidores de Bcl-2 fue el navitoclax (ABT-263) capaz de inhibir Bcl-2 y otras proteínas de la misma familia como Bcl-XL, Bcl-W. Aunque los estudios iniciales mostraban una elevada actividad

anti-tumoral, la trombopenia severa que producía limitó considerablemente su aplicación. Dicho agente fue rediseñado para que fuera más selectivo, dando lugar al venetoclax o ABT-199. Venetoclax fue evaluado en un ensayo fase I/II (96), que ha identificado la dosis de 400 mg como la dosis a aplicar en la fase II del mismo. La elevada frecuencia de la supervivencia libre de tratamiento (SLT) obligó a rediseñar el estudio, con una fase ascendente progresiva. Los datos iniciales comunicados son muy alentadores, con una tasa de RG del 79% y de RC del 22%. La mediana de SLP fue de 20.5 meses. Estas respuestas parecen duraderas en el tiempo.

1.5.2.5 Inmunomoduladores

Lenalidomida

Es un análogo de la Talidomida de segunda generación con propiedades inmunomoduladoras y antiangiogénicas, con amplia experiencia en el tratamiento del mieloma múltiple y de los síndromes mielodisplásicos, y en fase de estudio en la LLC. Su actividad como agente único arroja una tasa de respuestas entre el 32% y el 54%. Estudios en modelos animales mostraron que dicho agente induce una expansión de las células inmunes efectoras y potencia la ADCC, por lo que se propuso su potencial combinación con Rituximab para ser testado en ensayos clínicos. Hasta un 58% de los pacientes experimentan la denominada reacción de exacerbación tumoral (*tumor flare reaction*), que corresponde a un cuadro de febrícula, aumento del tamaño de las adenopatías y dolor local que sólo aparece en los pacientes con LLC.

La combinación de Lenalidomida/Rituximab en un ensayo fase II realizado en LLC-B R/R a dosis de 10 mg/d mostró una tasa de RG del 66% y RC 12%, con un 12% de RPn (97). La toxicidad grado 3-4 más frecuente fue la neutropenia (73%). Estos datos la han posicionado como una alternativa para los pacientes LLC R/R. Actualmente su papel en la consolidación de la respuesta a la primera línea de tratamiento está siendo investigado.

CARs

Los receptores de antígenos quiméricos CARs (*chimeric antigen receptors*) son proteínas de fusión que incorporan un dominio de reconocimiento antigénico y uno de activación del linfocito T. Los linfocitos T pueden ser modificados genéticamente para expresar CARs y pueden ser transferidos a los pacientes. Los CARs más ampliamente estudiados han sido los dirigidos al antígeno CD19 presentes en los linfocitos B. Diversos grupos están realizando ensayos fase I/II en pacientes con LLC con unos resultados muy prometedores (98, 99).

Trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH)

Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH)

Estudios aleatorizados entre el TAPH y el tratamiento quimioinmunoterápico muestran que el TAPH permite obtener una SLP más prolongada que la quimioinmunoterapia, sin que esto se traduzca en una ventaja respecto a la supervivencia (100, 101). En consecuencia, el TAPH ha sido progresivamente abandonado del abordaje terapéutico de estos pacientes.

Trasplante alogénico

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) es la única modalidad que es capaz de obtener RC mantenidas con enfermedad mínima residual negativa de manera prolongada en el tiempo y por tanto la curación de estos pacientes. Dicho efecto cabe atribuirlo a un efecto injerto contra leucemia (GVL, *graft versus leukemia*) que en ocasiones acompaña a la enfermedad injerto contra huésped (GVHD, *graft versus host disease*) (102). Se considera un procedimiento de elección en los pacientes con LLC de alto riesgo que cumplen los siguientes criterios: refractariedad a análogos de purinas, recaída en menos de 2 años de un tratamiento quimioinmunoterápico que contiene análogos de purina y/o delección de 17p/mutación de p53.

Dado que el alo-TPH convencional se asocia a una mortalidad relacionada con el procedimiento de hasta el 50%, se ha diseñado el denominado acondicionamiento de intensidad reducida que permite su aplicación en pacientes de edad avanzada con una mejor tolerancia al procedimiento. Con esta modalidad, la mortalidad relacionada con el procedimiento oscila entre el 15-30% durante los dos primeros años, ligada fundamentalmente a GVHD aguda y crónica. Diversos estudios realizados en pacientes con factores de muy mal pronóstico, como la delección de 17p, han mostrado ventajas para el Alo-TPH (103).

1.5.2.6 Valoración de respuesta

Los criterios de valoración de respuesta fueron actualizados por el IWCLL en el 2008, y su principal variación fue la incorporación del estudio de EMR. Los diferentes

tipos de respuesta se muestran en los anexos (tabla de criterios de valoración de la respuesta).

La introducción de nuevas técnicas de detección de la enfermedad con una mayor sensibilidad, como la CMF de 4 colores y la PCR cuantitativa, permiten detectar 1×10^{-4} y 1×10^{-5} células leucémicas, respectivamente. La disponibilidad y la rapidez de la CMF ha permitido su incorporación a la valoración de la respuesta permitiendo discriminar mejor la calidad de la misma. Así, la RC con EMR negativa se define como la ausencia de detección de una célula leucémica en 10^4 células normales (10). La cuantificación de la EMR tras el tratamiento muestra un claro impacto pronóstico en términos de respuesta y supervivencia. Así, la detección de la EMR en 471 pacientes tratados con FCR vs FC (ensayo CLL8) mostró que la obtención de una EMR inferior a 10^{-4} era más probable con FCR que con FC, y ello se asoció a una SLP más prolongada (68,7 vs 15,4 meses; EMR 10^{-2}) (104). En base a ello, y en el contexto de ensayos clínicos, se recomienda realizar estudios de EMR mediante citometría de flujo.

Otro aspecto importante que emerge de la incorporación de los nuevos ITK, es que estos pacientes presentan unos periodos de SLP notablemente más prolongados que los obtenidos con los esquemas de quimioinmunoterapia, pero el tipo de respuesta rara vez alcanza una RC/EMR negativa (92). Es posible que los criterios deban ser revisados en un futuro cercano con la utilización de estos nuevos fármacos.

2. Etiología y patogenia de la LLC-B

2.1 Origen celular

A lo largo de los años se ha hipotetizado sobre la célula que da origen a la enfermedad pero, en el fondo, estas dudas simplemente reflejaban la tecnología disponible en el momento de la formulación de cada hipótesis (105) (106). Aún en la actualidad no existe consenso sobre cuál es la célula normal sobre la que se origina la LLC, aunque todos los autores sugieren que debe tratarse de un linfocito B que ha tenido

contacto con el antígeno (linfocito B memoria) debido a la presencia de marcadores de activación en el fenotipo de las células malignas y a su perfil de expresión génica. Estudios más recientes, tanto genéticos como epigenéticos (107), apuntan hacia una doble célula de origen para cada tipo de LLC. Según la teoría más aceptada en la actualidad, la LLC con IGHV mutada derivaría de un linfocito B CD5+/CD27+ que ha contactado con el antígeno a través de una reacción centrogerminal (vía T dependiente), y por tanto ha sido sometido al proceso de hipermutación somática y presentaría mutaciones en la region IgVH. Este subgrupo de linfocitos CD5+/CD27+ normales, además, presenta mutaciones en otras proteínas como BCL6, lo que apoya todavía más el concepto de que estas células han pasado por el centro germinal. La expresión de IgG en la superficie de las formas mutadas apoyaría su procedencia a partir de un linfocito B postgerminal (ha experimentado el fenómeno de cambio de clase).

En cuanto a las formas no mutadas de LLC-B derivarían de un linfocito B CD5+/CD27-, que ha contactado con el antígeno fuera del centro germinal, por una vía T-independiente. En consecuencia estos linfocitos B, al igual que en las formas leucémicas no mutadas no expresan CD27 en su membrana y no han experimentado el fenómeno de hipermutación somática, y por tanto no presentan mutaciones en IgVH. Asimismo, el papel de un estímulo antigénico como método de selección clonal quedaría reflejado en el hecho de que las formas no mutadas, presentan una conformación de BCR muy similar entre sí y suelen expresar anticuerpos polireactivos (Figura 1.3).

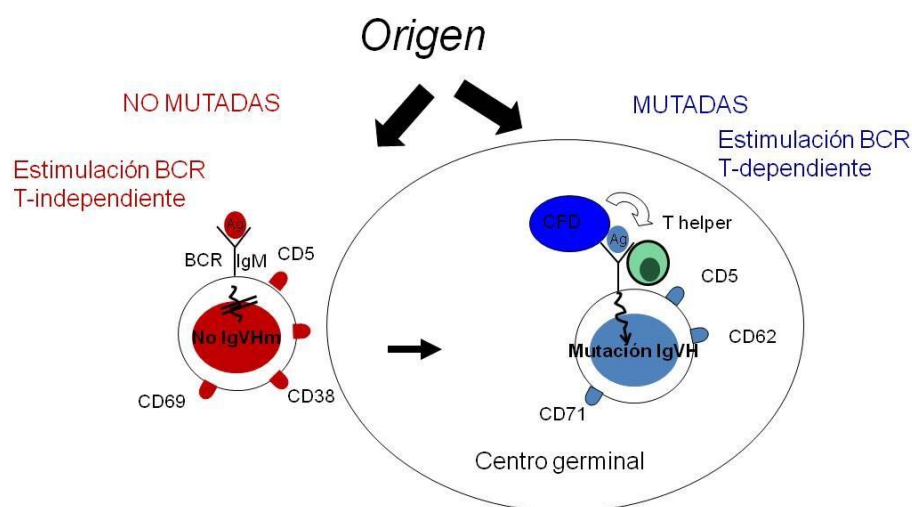


Figura 1.3 Estado mutacional. Las formas no mutadas derivarían de una célula que ha sido estimulada por un antígeno fuera de una estructura centrogeminal, por vía T-independiente. En estas condiciones, el BCR es incapaz de experimentar el proceso de hipermutación y queda en un estado de actividad que favorecería la evolución clonal y que se correspondería con la agresividad clínica de la enfermedad. En las formas mutadas, la célula de origen habría sido estimulada por un antígeno por vía T-dependiente y ello se acompaña del fenómeno de hipermutación y con frecuencia de un estado de anergia.

2.1.1 Linfocitosis B monoclonal (LBM)

Cerca de un 3,5% de adultos sanos sin antecedentes familiares presentan expansiones oligoclonales de células B CD5 + con un patrón de expresión antigénica similar al de la LLC (108). Este porcentaje se eleva al 13% en individuos sanos con antecedentes familiares de primer orden de LLC. Otros estudios muestran que dichas expansiones clonales presentan una frecuencia claramente dependiente de la edad, estando presente entre el 88-100% de los individuos normales mayores de 70 años. La LBM evoluciona a LLC y otros tipos de linfoma a razón de 1% anual. Algunas de estas células muestran alteraciones citogenéticas iguales a las detectadas en la LLC abierta. Por

ello, se ha sugerido que la linfocitosis B monoclonal representaría una forma “precoz” de LLC, que evolucionaría abierta y progresivamente a LLC tras la concurrencia de eventos genéticos o epigenéticos adicionales que implican a genes claves en la diferenciación B (109).

2.1.2 Célula B ROR1+

Estudios muy recientes muestran que las células de la LLC expresan el receptor huérfano *tirosina-quinasa like* (ROR1) que suele estar expresado únicamente durante el desarrollo embrionario. Este receptor también se encuentra presente en una pequeña población de células B que expresan CD5 y CD10 conocida como hematogonias, y que se encuentran en la médula de pacientes pediátricos en fase de recuperación de un trasplante de precursores hematopoyéticos. Éstas células también son detectables a niveles muy bajos (0,01% a 0,1%) en donantes sanos, y su perfil de expresión antigénica es heterogéneo, con una fracción positiva a CD19 y CD27 y negativa para CD38 mientras que otra fracción expresa CD38 y CD19 pero muestra ausencia de CD27. Esta fracción además presenta elevados niveles de CD5 y CD23.

Todo ello apunta a que el auténtico precursor de la LLC pudiera ser esta subpoblación celular CD5+, CD38+, ROR1+, no obstante, dicha hipótesis necesita ser confirmada con estudios de expresión adicionales que comparen dicha fracción con el patrón de expresión de la LLC.

2.1.3 Papel de las células pluripotenciales (*stem cells*)

Algunos estudios de xenotrasplante, derivados de pacientes con LLC, han mostrado que las células stem de estos pacientes son capaces de diferenciarse hacia precursores B que finalmente adquieren un patrón antigénico propio de la LLC (110). No obstante, estas células de LLC originadas de las células pluripotenciales, con frecuencia tienen alteraciones cromosómicas diferentes del clon original, incluso un distinto estado mutacional IgVH. Está en discusión si esta subpoblación pudiera constituir una auténtica célula madre (*stem cell*) de la LLC ya que diversos hallazgos indican que se requieren de

eventos genéticos o epigenéticos adicionales para el desarrollo pleno de la enfermedad, aunque datos obtenidos en modelos experimentales apoyan su implicación en el proceso (111) (Figura 1.4).

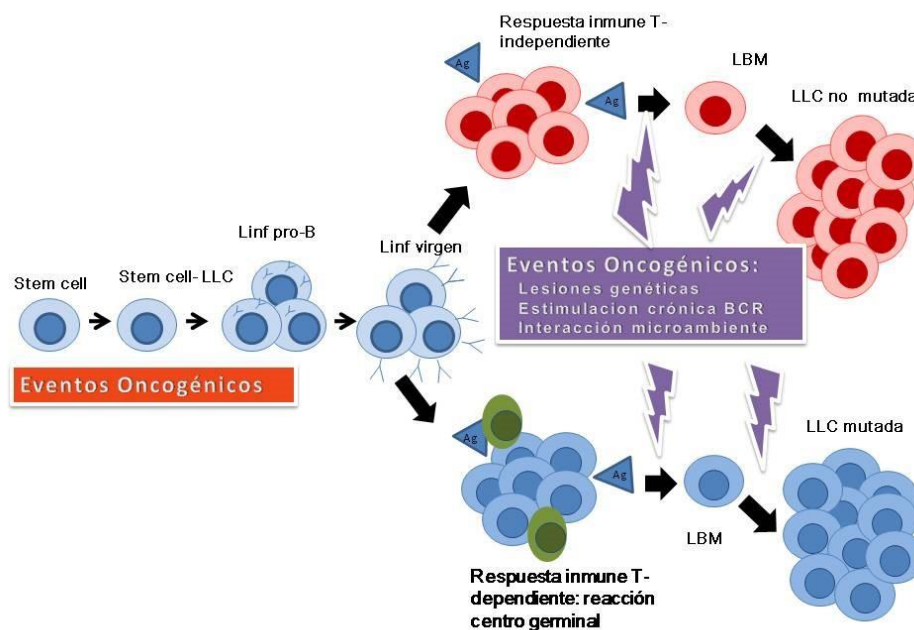


Figura 1.4 Origen celular. Esquema del modelo de origen de la LLC más aceptado en la actualidad (112). Ya en estadios muy iniciales de la diferenciación B, aparecerían mutaciones que afectarían a las *stem cells*. Estas células pluripotenciales mutadas serían capaces de generar linfocitos B con ligeras ventajas en supervivencia y proliferación, que tras ser expuestas a un antígeno por vía T independiente o por vía T dependiente (reacción centrogerminal) darían lugar a un precursor B no mutado o mutado, respectivamente, en lo que se conoce como linfocitosis B monoclonal. La adición sucesiva de eventos genéticos y epigenéticos, conduciría a que las personas con LBM con precursor no mutado desarrollaran formas no mutadas de LLC, mientras que la incidencia de otros eventos oncogénicos en los precursores originados por vía T-dependiente generarían formas mutadas de LLC. La expansión clonal posterior de la enfermedad a través de la capacidad de interacción de la célula de la LLC con su microambiente a través del

receptor de la célula B o de otros mecanismos daría lugar o no a una evolución clonal y a un perfil cinético propio.

2.2 El microambiente celular

2.2.1 Efectos del microambiente celular en la LLC-B

La diferenciación, mantenimiento y expansión de células tumorales en el microambiente de la médula ósea (BM), es un proceso altamente coordinado que involucra la participación de múltiples factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas secretadas por las células tumorales (vía autocrina), células estromales (vía paracrina), y por contacto directo células estromales-células tumorales (vía yuxtacrina) (113).

El microambiente tumoral está integrado por el conjunto de células no neoplásicas y las proteínas secretadas por las mismas que participan en el desarrollo y progresión tumoral, entre las que se encuentran distintos tipos de células estromales incluyendo células endoteliales, células estromales, células dendríticas, macrófagos, células nodriza (*nurse like cells*) y linfocitos T. Las células de la LLC-B interactúan con dichos tipos celulares en los denominados “centros de proliferación” o “pseudofolículos”, estructuras tisulares situadas en la médula ósea y los ganglios linfáticos, y que constituye una entidad histopatológica reconocida en la LLC-B. Se reconocen como unas zonas pálidas constituidas por prolinfocitos y parainmunoblastos sobre un fondo de linfocitos pequeños y maduros. Los linfocitos de la LLC-B que se sitúan en estas estructuras tienen mayor índice de proliferación expresado por Ki-67 y CD71, co-expresión de survivina y elevada positividad por CD20, CD23 y MUM-1/IRF-4. La presencia de una elevada cantidad de dichas estructuras en la LLC-B identifica un grupo de pacientes con una forma “acelerada” de la enfermedad que implica un pronóstico más agresivo (114).

Las primeras evidencias de la importancia del microambiente en la progresión tumoral derivan del hecho de que las células de la LLC-B en suspensión experimentan una muerte celular espontánea o apoptosis mientras que su co-cultivo con células

estromales o células dendríticas prolongaba significativamente su supervivencia (115-117).

El microambiente de la médula ósea y los órganos linfoides secundarios presentan una composición celular diferente destinada a favorecer la diferenciación y maduración del linfocito B. Así, en la médula ósea, las células mesenquimales del estroma favorecen la adquisición de un BCR funcional y favorecen la posición del linfocito B en el interior de los centros germinales. En los órganos linfoides periféricos, las células “nodriza” de origen monocitario, proporciona una serie de señales de proliferación que favorecen la activación de BCR en dichas ubicaciones. Los linfocitos T se encargan de inhibir o promover la expansión del linfocito B, dependiendo del subtipo de linfocito T y su localización anatómica.

Células mesenquimales del estroma medular (BMSC)

Las MSC son un importante componente del estroma que favorece el mantenimiento a largo plazo de las células madre hematopoyéticas (HSC) (118). En la LLC-B, las MSC protegen a las células tumorales de la apoptosis espontánea y también de la apoptosis inducida por fármacos (34, 119). Asimismo, dichas células participan en la migración y retención de los linfocitos neoplásicos en la médula ósea. Ello queda plasmado en el denominado fenómeno de “pseudoemperipolesis” y que describe la migración espontánea de los linfocitos neoplásicos por debajo de las células mesenquimales a las escasas horas del co-cultivo (120). En los órganos linfoides secundarios, sobretodo en los ganglios linfáticos, existen otros subtipos celulares accesorios, como las células foliculares dendríticas, los macrófagos y los linfocitos T.

Existen diversas vías de señalización implicadas en la interacción entre las MSC y los linfocitos B neoplásicos. Las MSC secretan un conjunto de quimiocinas (CCL2, CCL4, CCL5, CCL20, CXCL12 y CXCL8) y los receptores de quimiocinas CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5 y CXCR6) que juegan un papel muy importante en la regulación de la migración de los linfocitos neoplásicos a la médula ósea y su retención en dicho compartimento, en donde reciben señales de supervivencia, proliferación y

diferenciación celular (121). Una de las principales vías implicadas es CXCR4/CCL12 (122).

Otra de las vías implicadas recientemente analizadas es la vía de Notch-1 (56). Las células del estroma expresan receptores y ligando de dicha vía, que son proteínas transmembrana que tras la unión a su ligando experimentan una ruptura y liberación del dominio intracelular NICD (*Notch receptor intracellular domain*), que actúa como un factor de transcripción, translocándose al núcleo y regulando la expresión de una serie de genes diana. Entre ellos regulan la sobreexpresión de MYC (123), de la proteína anti-apoptótica bfl-1 y de la regulación a la baja de PTEN con la consecuente activación de la vía PI3K/AKT. La interacción linfocito neoplásico-MSc es bidireccional, activándose las MSC como consecuencia de la misma (124). Así, esta interacción produce una activación de la proteína-quinasa C (PTK, del inglés, proteína kinase C) y la subsecuente activación del sistema NF- κ B (125). También los sobrenadantes de los cultivos de LLC-B activan los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRs, *platelet-derived growth-factor receptor*) de las MSC (126).

Células nodriza (NLC, Nurse like cells)

Las NLC son células estromales que se pueden originar *in vitro* a partir de la fracción monocitaria CD14 + y que rodean y prolongan la supervivencia de las células de la LLC-B. Estas células se encuentran en el bazo y ganglios linfáticos de los pacientes con LLC-B y su importancia en la progresión tumoral ha sido recientemente identificada en un modelo animal de LLC (127). Las NLC atraen a los linfocitos neoplásicos secretando la quimiocina CXCL12 y CXCL13 (128) y las protege de la apoptosis a través de la vía CXCL12/CXCR4 (129), APRIL (130), CD31, plexina y la activación de la cascada intracelular de BCR (131). Estudios recientes de expresión génica muestran que las NLC y las MSC activan rutas de señalización diferentes en los linfocitos neoplásicos. Así, las MSC inducen una regulación al alza del gen TCL-1 seguido de una disminución en la interacción TCL-1/JUN. Sin embargo, las NLC inducen en el linfocito neoplásico la señalización mediada por NF- κ B y BCR (132, 133).

2.2.2 Mecanismos de progresión y homing en la LLC-B

2.2.2.1 Quimiocinas y sus receptores

Los linfocitos B normales circulan y anidan (*homing*) en base a las interacciones de los mismos con las células del estroma y bajo la acción de sustancias solubles producidas por las mismas, como son las quimiocinas, que facilitan la entrada y posicionamiento en los diversos compartimentos tisulares. El tráfico linfocitario requiere de la cooperación entre los receptores de las quimiocinas y otras moléculas clave conocidas como moléculas de adhesión, como las integrinas, L-selectinas y CD44. Las quimiocinas inducen una activación de las integrinas regulando su función (134, 135). Los linfocitos B y T expresan diversos tipos de quimiocinas y sus receptores, y su expresión y función modulan los procesos de diferenciación y activación (134). Así, los linfocitos circulantes contactan de manera transitoria y con carácter reversible con el endotelio vascular a través de las L-selectinas, en un proceso llamado *rolling*.

Las quimiocinas presentes en la superficie del endotelio vascular activan las integrinas presentes en la superficie del linfocito y favorecen la adhesión intensa y transigración del mismo a través del reconocimiento de sus ligandos específicos en la superficie del endotelio (VCAM). El gradiente de quimiocinas presente en los tejidos favorece el posicionamiento de los linfocitos en los correspondientes compartimentos, en un proceso conocido como *homing* o anidamiento. En los procesos linfoproliferativos, los linfocitos neoplásicos retienen la capacidad de su compartimento fisiológico normal en su respuesta a dichas sustancias, tal y como se ha demostrado en la LAL y en la LLC-B. A continuación se detallan algunos de estos receptores (136).

Quimiocinas y sus receptores

Las quimiocinas son una familia de citocinas integrada por dos subfamilias, las C-X-C o las CC en función de la existencia o no de un aminoácido separando los 2 residuos de cisteína (137). Las principales quimiocinas expresadas por los linfocitos de la LLC-B son CCL3 y CCL4, y sus principales receptores CXCR4, CXCR5 y CCR7.

CXCR4/CXCL12

CXCR4 se encuentra sobreexpresado en los linfocitos tumorales de la LLC-B y su ligando, la quimiocina CXCL12 (previamente conocido como SDF-1) es expresada de manera constitutiva y a altas dosis por las células del estroma, las BMSC y las NLC. La unión CXCR4/CXCL12 se traduce en una internalización del receptor y el desencadenamiento de una serie de señales intracelulares que conducen a la quimiotaxis de las células, la migración a través del endotelio vascular, la polimerización de la actina y la subsecuente migración bajo la capa del estroma en el denominado proceso “pseudoemperipolesis” (138). CXCL12 también tiene un efecto antiapoptótico (139). La expresión de CXCR4 es regulada por su propio ligando, de modo que las altas concentraciones de CXCL12 presentes en los tejidos producen una regulación a la baja en la expresión del mismo, y por tanto la retención del linfocitos neoplásico en el compartimento tisular. Este fenómeno es la base de que los linfocitos de la LLC-B expresen bajos niveles de CXCR4 en contraposición a los linfocitos circulantes (133, 138).

La respuesta a CXCL12 está a su vez regulada por otras vías, como la señalización BCR y la expresión de CD38, de manera que la estimulación BCR se traduce en una regulación a la baja de CXCR4 (140, 141), y un aumento en la quimiotaxis mediada por CXCL2 y CXCL3. Las células de la LLC-B con expresión de Ki-67 y por tanto con capacidad proliferativa, expresaban menor densidad de CXCR4 y CXCR5 en su membrana que las células quiescentes (142). Los estudios funcionales *in vivo* con agua pesada ($^2\text{H}_2\text{O}$) han demostrado que las células de la LLC-B que se encuentran proliferando en los tejidos una marcada heterogeneidad de expresión intraclonal en la LLC, con una menor expresión de CXCR4 en la fracción CD38+/CD5 intenso, y una mayor captación de deuterio (^2H). Dichos pacientes también tenían una producción retardada de la fracción de CD38 en la sangre y mayor grado de infiltración tisular y ganglionar (143).

Las células de LLC-B con elevada expresión de ZAP-70 presentan una mayor capacidad de migración contra un gradiente de CXCL12 y una mayor supervivencia que

los linfocitos ZAP-70 negativos (144, 145). La expresión de CD38 también se asocia a una mayor quimiotaxis hacia CXCL12, mientras que los anticuerpos frente a CD38 bloquean dicho proceso. La señalización mediada por CXCR4 es sensible a la acción de la toxina pertúsica e induce la movilización de calcio intracelular favoreciendo la polimerización de la actina, la activación de la quinasa PI3K las p44/42 MAPK, así como la fosforilación de STAT3 (146), (147). Dicha señalización puede ser inhibida por los inhibidores de PI3K (Idelalisib) (148), inhibidores de Sky y de BTK (Ibrutinib) (149). Todo ello identifica al eje CXCR4/CXCL12 como una potencial diana en esta enfermedad (Figura 1.5).

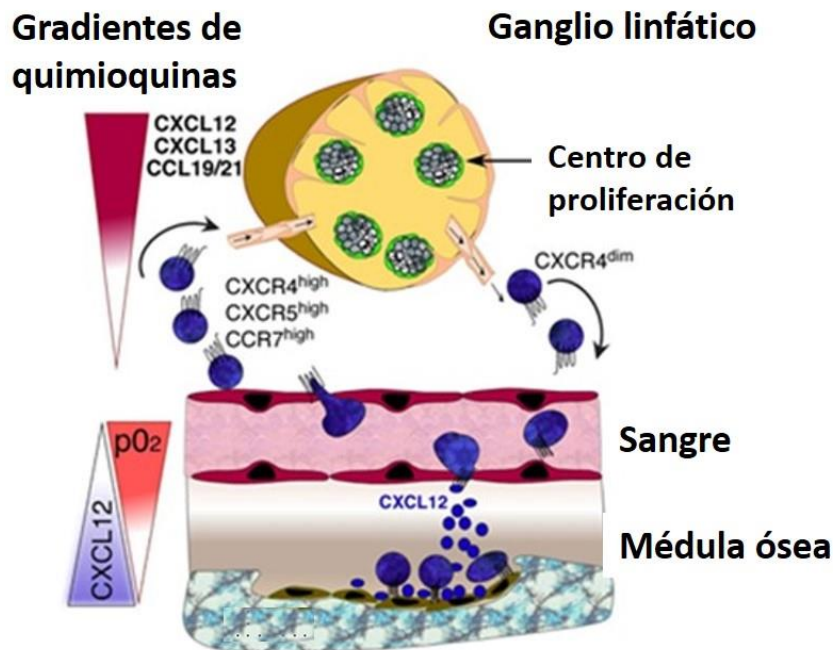


Figura 1.5 Papel del eje CXCR4/CX12 en la migración y *homing*. Las células de LLC que circulan en la sangre periférica, se ven atraídas hacia los ganglios linfáticos y la médula ósea por los gradientes de quimiocinas CXCL12, CXCL13 y CCL19/21 establecidos por las células del estroma, que se unen a CXCR4, CXCR5 y CCR7 en células de LLC, respectivamente (150). El eje CXCR4-CXCL12 es el factor

predominante para este proceso. Los niveles de expresión de CXCR4 en células de CLL en sangre se pueden utilizar para distinguir las células que se encuentran en su camino hacia los tejidos (CXCR4 alta) frente a células de CLL que recientemente han salido los tejidos (CXCR4 baja).

CXCR5/CXCL13

CXCR5 es el receptor de la quimiocina CXCL13 producida por las células del estroma de las áreas B de los ganglios linfáticos. La unión CXCR5/CXCL13 favorece el posicionamiento de los linfocitos B en los folículos linfoides secundarios. Se ha sugerido que la principal función de CXCL13 sería posicionar los linfocitos B en los órganos linfoides secundarios para mediar las respuestas por vía T independiente. Las células de la LLC-B expresan niveles elevados de CXCR5 y la unión CXCR5/CXCL13 señala a través de las proteínas G, PI3K y p44/42/MAPK (136).

CCR7

Receptor de las quimiocinas CCL19 y CCL21, constitutivamente expresadas por las células endoteliales, células foliculares dendríticas y células del estroma de los órganos linfoides secundarios. El eje CCR7/CCL19/21 está fundamentalmente implicado en el desarrollo y circulación de los linfocitos T, pero también afecta a los linfocitos B. En la LLC-B, las células presentan niveles intermedios altos de CCR7 y su sobreexpresión se ha relacionado con la presencia de adenopatías (137). La expresión de CCR7 también se ve regulada por la señalización BCR. Así, un aumento en la señalización BCR se ha relacionado con una mayor expresión de CCR7 a través de la vía ERK1/2, y un incremento de la migración hacia CCL19/21 (145). También se ha visto que la unión CCR7/CCL19/21 induce una mayor migración/polimerización de la actina en los linfocitos neoplásicos ZAP-70 positivos.

CCL3/CCL4

Quimiocinas secretadas por las células hematopoyéticas que intervienen en la respuesta inmune adaptativa como son los macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y

T. En la LLC-B la estimulación de la vía BCR induce la producción de CCL3/CCL4 por parte de las linfocitos neoplásicos, y ello se acompañaría de una atracción y retención de los linfocitos T a los tejidos, generando así un microambiente favorable para las células tumorales que les proporciona señales de proliferación y supervivencia (132). Los pacientes con LLC-B presentan niveles elevados de CCL3 y CCL4 y estos niveles están asociados a factores clínico-biológicos adversos y a una menor supervivencia (151).

2.2.2.2 Moléculas de adhesión

Constituyen una familia de moléculas de membrana íntimamente imbricadas en los mecanismos de reconocimiento "célula-célula" y célula-matriz extracelular", a través de los cuales regulan gran cantidad de procesos como la extravasación leucocitaria en la inflamación, el inicio de la respuesta inmune y el tráfico linfocitario en condiciones fisiológicas. Se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo y su especificidad "receptor-ligando" es variable, dependiendo del tipo celular en el que se expresan.

Se conocen diferentes familias de moléculas de adhesión, entre las que destacan tres: las selectinas, las integrinas y la superfamilia del gen de las inmunoglobulinas. Las integrinas son heterodímeros de membrana de naturaleza proteica, constituidas por la asociación no covalente de dos cadenas polipeptídicas alfa y beta. Dentro de las $\beta 1$ integrinas cabe destacar la $\alpha 4\beta 1$ o VLA-4 (*very late antigen-4*), ampliamente distribuida en todo el sistema hematopoyético. Las selectinas son proteínas transmembrana que reconocen secuencias glicídicas para facilitar la adhesión de las células a los tejidos en una fase inicial o de *rolling* que después es seguida de una activación de los receptores de quimiocinas, integrinas y finalmente de la transmigración celular a través del endotelio. Destaca la selectina L o CD62L, ampliamente distribuida a nivel leucocitario y cuyo ligando es GlyCAM-1.

CD49d/CD29

La integrina $\alpha 4\beta 1$ o (VLA-4) se expresa ampliamente en el sistema hematopoyético y en concreto en los linfocitos B y T, monocitos y otras células hematopoyéticas. A través

de la unión a su ligando VCAM-1 presente en la superficie del endotelio vascular, favorece la extravasación y trans migración de los linfocitos fuera del torrente circulatorio (152). Asimismo, es uno de los receptores de la fibronectina favoreciendo la adhesión intensa de los linfocitos B y otras células hematopoyéticas al estroma de los tejidos. En la LLC-B, CD49d/CD29 coopera con los receptores de quimiocinas CXCR4 y con el antígeno CD38 en su adhesión al estroma (153), formando un complejo junto a CD44, que regula al alza la producción de metaloproteinasa 9 (MMP9), y favorece la degradación de la matriz extracelular y por tanto la invasión tisular (154) (155). CD49d/CD29 también coopera con otros receptores de quimiocinas en la migración de los linfocitos neoplásicos al interior de los tejidos (35, 156). Este proceso se lleva a cabo a través de la activación de la vía Lyn/STAT3 y la sobreexpresión de Mcl-1. Las células de la LLC-B presentan una elevada expresión de CD49d/CD29 al igual que CXCR4, y ello está asociado a una mayor infiltración de médula ósea y a otros factores biológicos de mal pronóstico (157). CD49d/CD29 es capaz de mediar quimiorresistencia a fármacos, como la fludarabina y el trióxido de arsénico a través de mecanismos dependientes de p53 y de MMP9 (34, 158) (159). Su expresión en la LLC aporta información pronóstica en términos de supervivencia en diversas series (160, 161), por lo que se ha propuesto su inclusión como un marcador en los estudios de citometría de flujo.

CD62L

CD62L es un miembro de la familia de selectinas que favorece la circulación y retención de los linfocitos B y T en los distintos tejidos. CD62L se une a su ligando, MadCAM-1, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas presente en el endotelio vascular e inicia así un proceso de adhesión suave, conocido como *rolling* (162). En la LLC dicha molécula parece estar implicada en los procesos de migración y supervivencia celular. Los niveles elevados de CD62L se han relacionado con un aumento en la capacidad de migración hacia los ganglios linfáticos y su inhibición provoca apoptosis en dichas células (162, 163).

Receptores Toll-like

Los receptores *Toll-like* (TLR, *Toll-like receptors*) son una familia de receptores primitivos que tiene un papel esencial en la defensa inmediata del huésped frente a patógenos invasores (164). Los TLR tienen una región intracitoplásmica llamada TIR (*Toll/IL-IR*) encargada de la señalización intracelular. La localización de estos receptores varía dependiendo del tipo, así los TLR1/2/4 se localizan en la membrana celular y son interiorizados al unirse a sus ligandos y los TLR 3/7/9 que reconocen estructuras relacionadas con ácidos nucleicos y no se expresan en superficie. La distribución de los TLR expresados por las células de la LLC-B es muy similar al expresado por los linfocitos B memoria normales. La estimulación concreta de uno de ellos, el TLR-9 induce la expresión de una serie de moléculas co-estimuladoras en el linfocito neoplásico (CD40, CD58, CD80, CD86, CD54) así como de citocinas (165). La unión de TLR-9 a su ligando CpG inicia el reclutamiento de una proteína, MYD88, que se sigue de una activación del complejo IRAK-TRAF6 (*IL-1 receptor-activated kinase* y *tumor-necrosis factor receptor-associated factor 6*). Este complejo genera una activación del complejo MAPK y de la IKK, produciendo una sobreexpresión de los factores de transcripción ligados a NF- κ B. Con ello se produce la proliferación, maduración y producción de anticuerpos por parte del linfocito B. Así, recientemente se ha descrito que la estimulación de la célula de la LLC-B con CpG y CD40L induce una diferenciación de los linfocitos neoplásicos hacia células CD20 productoras de anticuerpos poli y autorreactivos (166).

Por otro lado se ha visto que la estimulación de los TLR y su efecto posterior podrían estar influido directamente por la señalización BCR. Así, la estimulación de TLR-9 induce proliferación en las formas no mutadas de LLC mientras que induce apoptosis en las formas mutadas (167) (168).

CD40L

El CD40L es una proteína transmembrana de 45-50 kDa que pertenece a la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*). Se encuentra constitutivamente expresada en el sistema hematopoyético, en los linfocitos B, monocitos, células plasmáticas, progenitores CD34 y células dendríticas. También se expresa en

otros subtipos celulares como las células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos. Su expresión puede regularse al alza por citocinas como IFN- γ , IL-1/4, TNF- α y GM-CSF. Su función es promover la supervivencia y diferenciación celular (169).

El ligando de CD40 (CD40L) es otro miembro de la familia de TNFs que se expresa fundamentalmente en los linfocitos T, especialmente en los CD4. Su expresión se ve regulada al alza por la co-estimulación de CD3 y CD28, y también las interleucinas IL-1/IL-4. En la LLC, se identifican gran cantidad de linfocitos T en los centros de proliferación o pseudogerminales de los tejidos, y ello parece ser una vía fundamental en la génesis de la enfermedad (170). Estos linfocitos participan de manera activa en la patogénia de la enfermedad a través de la unión de CD40/CD40L, que se traduce en una activación, proliferación y supervivencia del linfocito neoplásico de la LLC-B. La estimulación de esta vía también induce la expresión de una serie de moléculas de activación sobre su superficie, como CD54, CD69, CD70, CD80 y CD95.

A su vez, la unión CD40/CD40L tiene un efecto anti-apoptótico en las células de la LLC-B, tanto de la apoptosis espontánea como de la inducida por fármacos (171, 172), a través de la regulación al alza de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-XL. Todo ello nos confirma el importante papel de esta vía en la patogénia de la enfermedad (Figura 1.6).

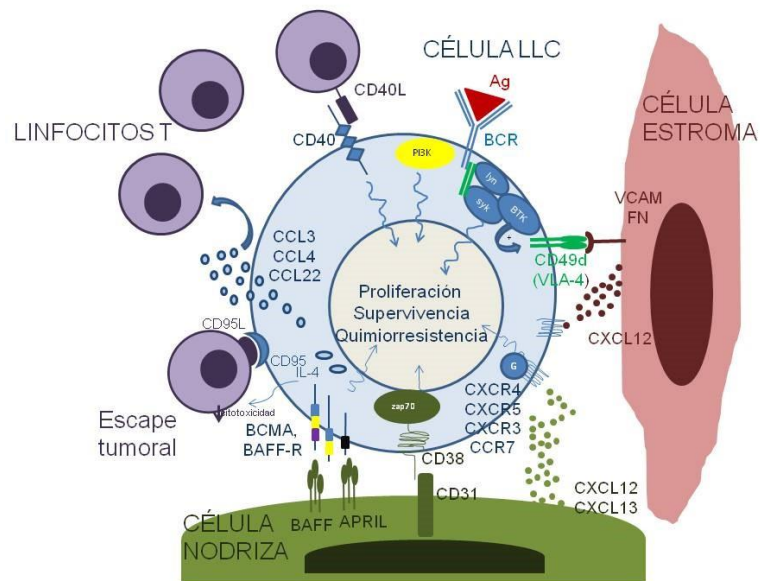


Figura 1.6 Interacción de la célula con su microambiente. Esquema de las principales vías de comunicación de la célula leucémica con los componentes de su microambiente.

2.2.2.3 El receptor de la célula B (BCR)

Una de las principales vías de señalización implicadas en la etiopatogenia de la LLC es la activada por el receptor de la célula B (BCR). La activación de esta estructura como consecuencia del reconocimiento de un antígeno, o de una estimulación tónica se traduce en una serie de señales intracelulares que inhiben la apoptosis y favorecen la proliferación. Estudios moleculares de última generación revelan que en las formas agresivas de LLC existe un aumento de expresión de diversos genes implicados en la señalización de esta estructura. Actualmente se acepta que los linfocitos neoplásicos de la LLC son inmunológicamente competentes y retienen ciertas capacidades inmunológicas que influyen en la biología y la evolución posterior de los pacientes. A continuación se revisa la señalización normal de BCR en el linfocito B y en la célula neoplásica.

Estructura de BCR

Está constituido por una molécula de inmunoglobulina IgM enclavada en la membrana celular y unida de manera no covalente a un heterodímero transmembrana integrado por dos cadenas (CD79a y CD79b) (Figura 1.7). Este heterodímero posee dos regiones ITAMs susceptibles de ser fosforiladas por un conjunto de proteínas que son reclutadas a su alrededor. Así, la unión la IgM a un antígeno soluble o unida a membrana se traduce en la fosforilación de dichos residuos ITAM por dos quinasas de la familia Src; Sky y Lyn. Esta fosforilación da lugar a un reclutamiento de diversas proteínas asociadas a la membrana celular para formar una estructura conocida como “signalosoma”. Esta estructura está integrada por diversas quinasas como la tirosina quinasa de Bruton (BTK), Sky, Lyn, y las proteínas adaptadoras Grb2 y BLNK. Este conjunto de quinasas se encargan de amplificar la señal, lo cual se acompaña de la agregación de estas estructuras en pequeños estructuras saculares de membrana conocidas como lipid rafts.

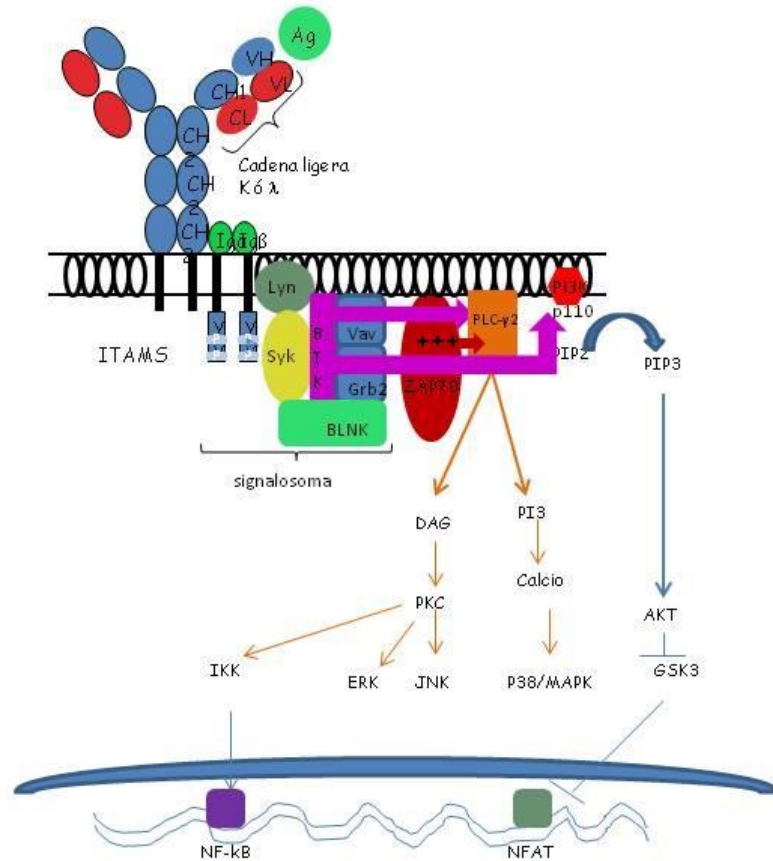


Figura 1.7 Estructura y vías de señalización del receptor BCR.

A diferencia de los linfocitos B normales, las células neoplásicas de la LLC tienen una baja expresión de IgM en superficie y datos indirectos de una estimulación tónica de BCR. No obstante, existe una clara evidencia de que la estimulación BCR es clave en la patogenia de la enfermedad. Así, estudios recientes demuestran que existe una regulación al alza de todos los genes implicados en la ruta BCR en las células neoplásicas de los ganglios linfáticos y de la médula ósea en comparación con la sangre periférica. Además, en la LLC la expresión de ZAP-70 favorece la señalización BCR a través de facilitar el reclutamiento de ciertas proteínas al signalosoma y además potencia la migración inducida por quimoquinas (173). Finalmente, los estudios *in vitro* muestran que los

pacientes ZAP-70 + presentan una mayor respuesta mediada por BCR (IgM) que los ZAP-70 negativos (174) (175). También existe evidencia de que la señal esta desregulada desde sus fases iniciales. Así, existe sobreexpresión de Sky y Lyn a nivel de RNA y de proteína así como un nivel de fosforilación superior de ambas quinasas en la LLC, en comparación con las células B normales.

Vías de señalización activadas por BCR

La señal iniciada en BCR es propagada hacia el interior de las células a través de tres sistemas: fosfolipasa C- subunidad $\gamma 2$ (PLC- $\gamma 2$), la quinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K) y BTK. Una vez se ha constituido el signalosoma y estas proteínas entran en íntimo contacto, la PLC- $\gamma 2$, es fosforilada por BTK y Sky, y ello genera dos segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol-trifosfato (IP3). El DAG activa la proteína-quinasa C y el sistema MAPK. El sistema MAPK regula una gran cantidad de factores de transcripción como: Erk1, c-Myc, ATF2, que dependiendo del nivel de maduración se traducirá en proliferación y aumento de la supervivencia o por el contrario en apoptosis. En la LLC existe una clara desregulación de la vía PLC/MAPK/ERK, con una fosforilación constitutiva de Erk, que podría estar contribuyendo a la supervivencia y proliferación de las células neoplásicas (176). La producción de IP3 conduce a un aumento de los niveles de calcio intracelular procedente tanto del retículo endoplásmico rugoso como del espacio extracelular. La activación inicial de BCR también activa la vía PI3K, a través de su subunidad p110 δ que es traslocada a la membrana. PI3K fosforila PIP2 y genera PIP3. PIP3 activa a su vez Akt a través de su fosforilación y disposición en la membrana. Akt fosforilada envía señales de supervivencia celular a través de la fosforilación de Bad y favorece la acumulación del factor nuclear de células T activadas (NFAT). La activación de este sistema se va a traducir en la regulación de la producción de citocinas a nivel nuclear (177).

BTK emerge como una proteína fundamental en la propagación de la señal iniciada por BCR, como se demuestra en el cuadro clínico conocido como agammaglobulinemia de Bruton caracterizado por la ausencia congénita de esta proteína.

La fosforilación de BTK por el complejo Sky/Lyn se amplifica por una autofosforilación de la propia BTK. Por otro lado, BTK produce una activación del complejo quinasa I κ B, con la consiguiente degradación por el proteosoma de I- κ B, la traslocación nuclear de NF- κ B y la consiguiente transcripción génica. La activación del sistema NF- κ B va a generar la expresión de una serie de genes implicados en la inflamación, proliferación y supervivencia celular B. Finalmente BTK recluta hacia la membrana nuclear a las quinasas 5 fosfatidilinositol (PIPI5Ks), que van a ser las encargadas de sintetizar PIPI2. PIPI2 va a ser fosforilada por PI3K dando lugar a la génesis de PIPI3. PIPI3 recluta BTK y otras proteínas al signalosoma lo cual se traduce en una amplificación mantenida de la señal de activación de BCR.

La activación de BCR va a influir en la funcionalidad de otros sistemas de membrana, como las integrinas. La unión de BCR a su ligando se va a traducir en un cambio conformacional de las integrinas a través de un mecanismo de señalización “inside-out” que potencia la adhesión de estas proteínas a sus ligandos y favorece las funciones de adhesión celular y migración (173). La expresión intensa de algunas VLA-4 (α 4 β 1) es un factor de mal pronóstico confirmado en esta entidad.

Papel de la selección antigénica en la LLC-B.

Los linfocitos B normales son cruciales en las respuestas inmunes adaptativas. Estas células en condiciones normales son las responsables de la producción de anticuerpos específicos frente a determinados antígenos, tanto exógenos como endógenos, favoreciendo su eliminación por parte del sistema monocito-macrófago. Esta función depende de la presencia y adecuada funcionalidad del receptor de la célula B, y en concreto de la existencia de un adecuado repertorio de BCR frente a diversos antígenos y de la posterior selección de los linfocitos B con la configuración de BCR con mayor afinidad por el antígeno. Ello genera una amplia diversidad de clones celulares capaces de reconocer y unirse de manera efectiva a su antígeno diana. La probabilidad de que dos clones celulares B independientes presenten una estructura similar es extremadamente baja, inferior a 10⁻¹². Sin embargo, en la LLC, las células procedentes de diversos

pacientes presentan un BCR casi idéntico, con unas características estereotípicas muy similares (37) (178). Asimismo, determinadas familias de segmentos IgVH se repiten en la LLC con una frecuencia claramente superior a la de los linfocitos B normales. Ambos hechos apoyan la hipótesis que las células neoplásicas de la LLC están reaccionando frente a un antígeno común y que dicho antígeno es capaz de contribuir a la selección clonal B leucémica.

Entre las estructuras antigénicas que reconocen los diversos BCR en la LLC se encuentran diversas proteínas expresadas en células en apoptosis, como la proteína de la cadena pesada de la miosina tipo IIA, asociada al citoesqueleto celular (179). Este tipo de BCR está más frecuentemente asociado a formas no mutadas de LLC. Aparte de auto-antígenos, las células de la LLC pueden reaccionar frente a antígenos microbianos o víricos (180). Así, la familia IgVH1-69 puede reaccionar con diversos microorganismos gram positivos o negativos e incluso con el citomegalovirus (CMV).

2.3 Modelo patogénico

En base a lo expuesto previamente, especialmente a los estudios cinéticos realizados con agua pesada en pacientes con LLC-B, el desarrollo abierto de la enfermedad depende de un delicado balance entre la proliferación neoplásica experimentada en el compartimento tisular y la apoptosis que se produce en sangre periférica. Así, La célula leucémica de la LLC es atraída hacia los tejidos por el eje CXCR4/CXCL12. Una vez penetra en el interior de los mismos, se produce una regulación al alza de la expresión de CD38 y una disminución en la expresión de CXCR4, con la finalidad de que la célula quede inmovilizada para poder interactuar adecuadamente con los componentes de su microentorno. En los denominados pseudofoliculos, es donde la célula contacta con los antígenos a través de su BCR, así como con las células mesenquimales y los linfocitos T. Todo ello, genera importantes señales de supervivencia y proliferación que facilitan la expansión del clon leucémico. Parte de ese componente celular, por mecanismos no bien conocidos, sale de nuevo al

torrente sanguíneo, en lo que se conoce como *pool* circulante. En la sangre, se produce una regulación a la baja de CD5 y CD38 y al alza de CXCR4, lo cual le permite recircular hacia el interior de los tejidos. Parte de este componente celular penetra de nuevo en los tejidos y parte va a morir por apoptosis. La continua re-entrada de las células en el compartimento tisular de manera repetida daría lugar a una expansión clonal que se correspondería con la progresión de la enfermedad (Figura 1.8).

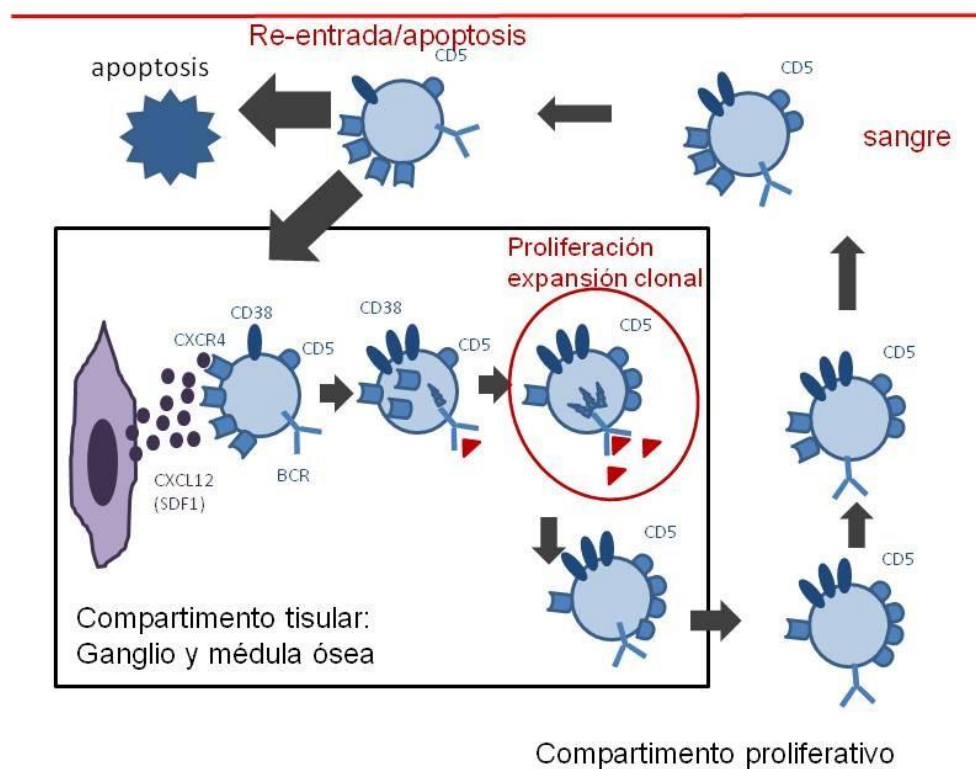


Figura 1.8 Esquema del mecanismo patológico.

3. Angiogénesis en la LLC-B

3.1 Generalidades

La angiogénesis es el proceso que permite la creación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes (181), (182). En condiciones fisiológicas participa en el crecimiento y desarrollo tisular, especialmente en la reparación de heridas y en la embriogénesis. En los tumores sólidos la angiogénesis es un mecanismo clave en la diseminación de las células malignas a otras zonas (183).

En las neoplasias hematológicas los mecanismos de angiogénesis no han sido tan profundamente estudiados como en los tumores sólidos. Diversas enfermedades hematológicas presentan elevados niveles de expresión de VEGF en sangre, relacionándose con un aumento de la densidad vascular en la médula ósea y los ganglios.

En la LLC-B como en otros tipos de neoplasia, los procesos de angiogénesis parecen estar implicados en la progresión tumoral (184). Los estudios realizados en este campo, señalan varios factores angiogénicos como: VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, *Basic fibroblast growth factor*), PDGF y MMP-9 como los factores más implicados en el desarrollo de este proceso (185). Estudios iniciales realizados por Peterson y cols mostraron un incremento de la angiogénesis en los pacientes con LLC-B frente a controles sanos. Además, objetivaron una correlación positiva entre la microdensidad vascular y los estadios avanzados de la enfermedad sugiriendo que dicho proceso podría estar implicado en la progresión tumoral a formas avanzadas.

El linfocito B neoplásico de la LLC-B es capaz de secretar una variedad de citocinas angiogénicas entre las que destacan el VEGF, el PDGF, angiopoietina-2 y trombospodina-1 (TSP-1) (7). La angiogénesis es regulada por el balance entre factores pro- y anti-angiogénicos. Una expresión anómala de este balance conduce al desarrollo de un microentorno pro-angiogénico.

Uno de los factores pro-angiogénicos más ampliamente estudiados en todos los tipos de neoplasia ha sido el VEGF.

3.2 Familia VEGF y su función

VEGF se expresa en muchos tipos de cáncer humano y dicha expresión se ve regulada por numerosos factores ambientales, como hipoxia (principalmente por el factor inducible por hipoxia HIF-1), pH bajo, diferentes interleucinas (IL-1, IL-6), factores de crecimiento como el bFGF, factor de crecimiento endotelial (EGF), factor de crecimiento transformante α y β (TGF- α y β), y PDGF, hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos) y quimiocinas (factor 1 derivado de células estromales). Otras causas, incluyen cambios genéticos inductivos como la activación de diferentes oncogenes (como Ras) o pérdida o inactivación mutacional de una variedad de genes supresores de tumores (p53 mutado) y óxido nítrico (186).

La familia del VEGF está compuesta por 7 tipos de glicoproteínas denominadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, factor de crecimiento placentario (PLGF) y el VEGF-F (187). VEGF-A es el mejor caracterizado. La unión de estas citocinas a sus receptores específicos con actividad tirosina quinasa (RTKs) desencadena una serie de señales intracelulares que promueven la angiogénesis e inhiben la apoptosis, participando en la vasculogénesis y linfangiogénesis. Existen cuatro tipos de receptores del VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y las neuropilinas (1 y 2).

Las células de la LLC-B expresan los tres tipos de receptor de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) (Figura 1.9).

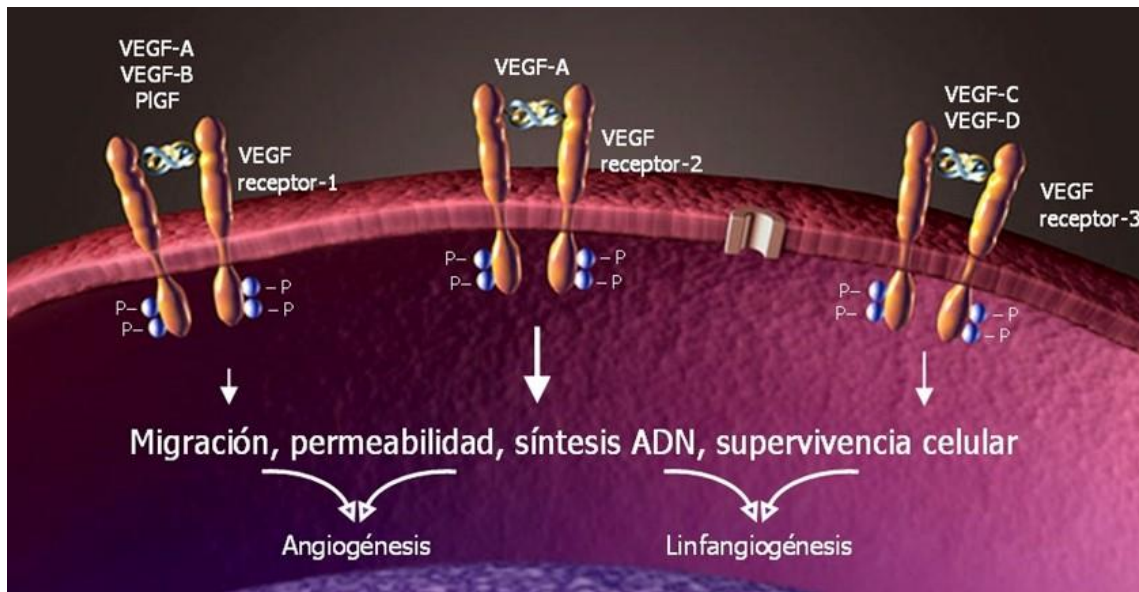


Figura 1.9 Esquema de los receptores de VEGF (VEGF-R1, VEGF-R2 y VEGF-R3).
Figura adaptada de Ferrara, N. y cols (188).

3.2.1 Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular VEGFR-1

VEGFR-1 conocido también como FLT-1, es una glicoproteína transmembrana de 180 KDa que pertenece a la familia de los receptores de tirosina quinasa. Se compone de siete dominios extracelulares homólogos a inmunoglobulinas y un dominio tirosina quinasa intracelular. El gen VEGFR1 codifica el receptor de membrana de 180KDa ya mencionado, y un receptor soluble de 110Kd que es generado por splicing alternativo del pre-mRNA y contiene el dominio de unión al ligando extracelular (VEGF) pero pierde el dominio tirosina quinasa de señalización.

La forma soluble de VEGFR1 (sVEGFR1) es un importante regulador negativo de la angiogénesis mediada por VEGF (189), puede unir VEGF con alta afinidad, secuestrándolo e inhibiendo la unión de éste al receptor anclado a la membrana, que por otra parte está implicado en proliferación y progresión tumoral. VEGF, sVEGFR1 y sVEGFR2 están incrementados en un 80% de los cánceres de mama (190), además siendo los niveles intratumorales de VEGF un indicador pronóstico en diversos tumores. Sin embargo, en análisis combinados, el ratio sVEGFR1/VEGF proporciona un valor

pronóstico más significativo estadísticamente que VEGF sólo. Por ejemplo en el cáncer de mama, en que los niveles de sVEGFR1 exceden en 10 el valor de VEGF tienen un pronóstico marcadamente favorable (191). Por lo que podemos considerar que el balance sVEGFR1/ VEGF puede ser crucial en la progresión del cáncer en general.

El VEGF actúa a través de los receptores de membrana VEGFR1 y VEGFR2, siendo un factor muy importante en la angiogénesis tumoral. VEGFR-1 se une a VEGF-A, VEGF-B y a PLGF con elevada afinidad, por sí sólo transmite señales débilmente mitogénicas, por ello está involucrado en la movilidad celular (192).

3.2.2 Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular VEGFR-2 (KDR)

VEGFR2 también llamado KDR, es una proteína de 230 KDa con dos variantes funcionales conocidas tras el procesamiento del mRNA, que se expresa principalmente en las células endoteliales, además de células madre hematopoyéticas y megacariocitos.

La expresión de VEGFR2 en las células endoteliales adultas parece tener un papel importante en los efectos mitogénicos y quimiotácticos de VEGF, participando de manera crucial en la angiogénesis y la hematopoyesis. Es uno de los mediadores de la actividad proliferativa y del aumento de la permeabilidad del VEGF.

La activación de las células endoteliales por VEGF conduce a la autofosforilación de VEGFR2 y la posterior fosforilación de la tirosina. Únicamente la forma glicosilada final del VEGFR-2 es capaz de autofosforilarse en respuesta al VEGF (27). Este receptor se une a VEGF-A y a formas maduras del VEGFC y D. La unión de VEGF a su receptor VEGFR-2 conduce a una cascada de diferentes vías de señalización.

La dimerización del receptor, seguido de la activación intracelular de la vía PCL γ - PKC-Raf quinasa-MEK-MAPK, que provoca subsecuentemente la iniciación de la síntesis de ADN y crecimiento celular, mientras la activación de la vía PI3K-AKT conduce al incremento de la supervivencia de las células endoteliales.

3.2.3 Receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular VEGFR-3

VEGF-R3 es un receptor de superficie celular tipo tirosina quinasa de 180 KDa altamente glicosilado y relativamente estable. Es denominado también Flt-4 y se compone de seis dominios homólogos a inmunoglobulinas, el quinto dominio se rompe proteolíticamente poco después de la biosíntesis, y las cadenas de polipéptidos resultantes permanecen unidas a través de un enlace por puente de disulfuro.

Se expresa en las células endoteliales vasculares durante las etapas tempranas del desarrollo, mientras que después de la organogénesis, permanece restringido a las células endoteliales linfáticas. VEGFR-3 se une a VEGF-C y VEGF-D.

En tumores sólidos se ha observado una sobreexpresión de VEGFR-3, así mismo se ha comprobado su importancia para la producción y desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, jugando un papel muy importante en la movilidad celular y capacidad invasiva del tumor, promoviendo la progresión tumoral. Sus ligandos están involucrados en la linfangiogénesis, al igual que en la angiogénesis y migración celular (193) (Figura 1.10).

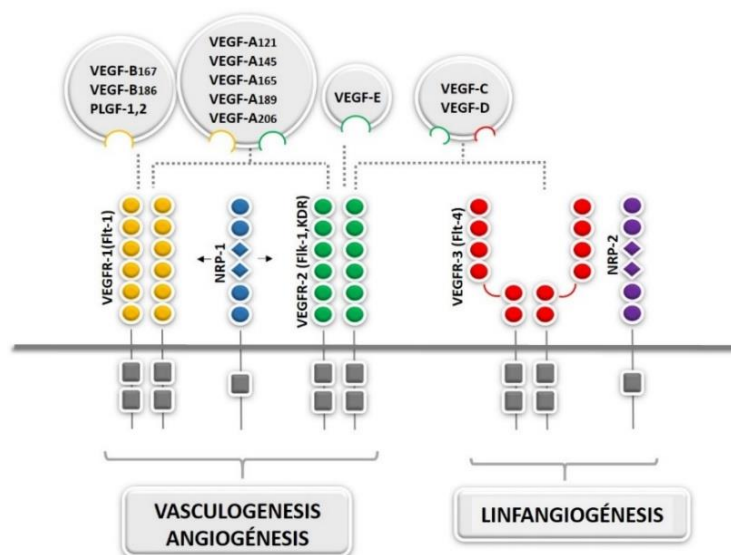


Figura 1.10 Uniones específicas de VEGF a sus receptores y su implicación en diferentes procesos biológicos.

3.3 VEGF como factor pro-angiogénico en la LLC-B

El VEGF es el factor pro-angiogénico clave en la LLC-B. Como ya se ha mencionado previamente, existe un aumento de la densidad vascular en la médula ósea y en los ganglios linfáticos de los pacientes con LLC-B. La hipoxia tisular existente en la médula ósea favorece la producción de HIF-1 (*hypoxia response factor-1*) que es un importante estímulo para la neovascularización (194). Las células de la LLC con capaces de secretar VEGF en respuesta a la hipoxia. Los ensayos de angiogénesis han permitido constatar que el VEGF secretado por las células leucémicas induce angiogénesis a través de un aumento en la proliferación de las células endoteliales (195). Asimismo, los sobrenadantes de los cultivos celulares de LLC promueven activamente la formación de las células endoteliales en los ensayos de matrigel. Este efecto es inhibido por los factores anti-VEGF (196).

3.4 Papel del VEGF en la supervivencia celular de la LLC-B

Además de su participación en la angiogénesis, VEGF es un reconocido factor anti-apoptótico en diversos tipos celulares, entre ellos las células endoteliales, las células neoplásicas de los tumores sólidos y las propias células de la LLC.

El factor VEGF producido por las células leucémicas, agonista del receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1), parece mediar su efecto anti-apoptótico de manera autocrina. Así, en la LLC-B los VEGF-R están constitutivamente fosforilados y esta fosforilación puede ser inhibida mediante la adición de anticuerpos anti-VEGF (197). Asimismo, el tratamiento *in vitro* con VEGF exógeno parece prolongar la viabilidad de las células neoplásicas. La unión de VEGF a VEGF-R2 se traduce en un activación de la vía STAT (198), con el consiguiente aumento de los niveles de proteína anti-apoptótica Mcl-1 y XIAP.

Dicho mecanismo autocrino no es homogéneo en todas las células de la LLC. Así, los linfocitos neoplásicos CD38 positivos sobreexpresan VEGF y el VEGF exógeno no parece influir en su supervivencia. Sin embargo la elevada expresión de VEGF

intracelular se ve inhibida cuando se añade un inhibidor de VEGFR-2, lo cual apoya el bucle autocrino como principal factor anti-apoptótico en las células CD38 positivas (199). Por el contrario, los clones CD38 negativos no sobreexpresan VEGF y la adición de VEGF exógeno si consigue prolongar la supervivencia celular. No existen datos sobre la correlación de los niveles de VEGF con la expresión de CD38 en series clínicas de pacientes.

VEGF también actúa por un mecanismo paracrino en la LLC-B. Estudios recientes apuntan que el VEGF producido por las células del estroma prolonga la supervivencia de los linfocitos neoplásicos en contraposición al VEGF autocrino (200).

3.5 VEGF como regulador de la migración. Implicación en el microambiente

El VEGF está implicado en la regulación de la migración del linfocito B neoplásico a través del endotelio en colaboración con la integrina CD49d/CD29. Así la inhibición de la expresión de VEGF autocrino mediante el RNA interferencia reduce la motilidad de las células a través del endotelio. No obstante, a dosis elevadas, el VEGF exógeno parece reducir la migración de los linfocitos neoplásicos en la médula ósea favoreciendo la retención de los mismos en dicho compartimento tisular.

La migración celular es fundamental para la progresión de la LLC-B. La migración transendotelial e invasión de órganos por células malignas también requiere la degradación de la membrana basal vascular y de la matriz extracelular de tejidos linfoides, y esto se lleva a cabo por las metaloproteinasas de la matriz (201).

Las células de LLC-B son capaces de producir y secretar metaloproteinasa 9 (MMP-9), encontrándose en forma monomérica, dimérica o asociada a la membrana celular. Éstas metaloproteinasas liberan factores de crecimiento unidos a la matriz extracelular estimulando la expansión tumoral y la angiogénesis (202), por lo que la MMP-9 tiene un papel importante en los procesos de migración y remodelación de la matriz extracelular por células LLC-B. Además, la inhibición de la actividad enzimática

de MMP-9 reduce la migración a través del colágeno de tipo IV o de monocapas de células endoteliales (201).

Se ha observado en diversas investigaciones, que el tratamiento con inhibidores de VEGF o con interferones disminuye la síntesis de MMP-9 por las células LLC-B (203). La expresión constitutiva de MMP-9 en células de LLC-B parece estar reglada por la señalización a través de la p38MAPK, y la inhibición de esta ruta reduce la expresión de la metaloproteinasas (204).

La producción de MMP9 se ve aumentada en los linfocitos neoplásicos de la LLC-B respecto a los linfocitos B normales, existiendo una regulación de su producción por las quimiocinas CXCL12 y por la integrina $\alpha 4\beta 1$ por vías independientes.

En las células endoteliales existe una correlación entre la estimulación de VEGF-R y la producción de metaloproteinasas por lo cual es posible que ambas vías puedan estar implicadas. Así, en las células endoteliales la estimulación de la vía VEGF-R produce un aumento en la síntesis de MMP9 (205). Se ha descrito una correlación entre los niveles elevados de MMP-9 intracelular presente en el suero de los pacientes LLC-B con el estadio de la enfermedad, asociándose este incremento a un mal pronóstico (206).

VEGF también podría jugar un papel relevante en el microambiente celular a otros niveles. La interacción de las células de la LLC con los componentes del mismo favorece la síntesis de VEGF por parte de las células estromales. Por otro lado, el tratamiento de las células primarias *in vitro* con CD154 y con ácido lisofosfatídico conduce a un aumento de la producción de VEGF y a una prolongación de la supervivencia (207).

3.6 Implicación pronóstica de VEGF

Los estudios iniciales sugerían el potencial papel del VEGF como factor pronóstico debido a su implicación en la progresión tumoral. Así, los niveles séricos e intracitoplásmicos de VEGF están elevados en los pacientes con LLC-B en contraposición a los controles sanos (208) (209). Asimismo, dichos niveles séricos son significativamente superiores en los estadios avanzados de la enfermedad frente a estadios iniciales, lo cual sugiere que este mecanismo de alguna manera facilita la diseminación tumoral (F1.12). Además, los niveles elevados de VEGFR-2 parece correlacionarse con una menor supervivencia (209). Dichos datos requieren ser validados en series más amplias de pacientes.

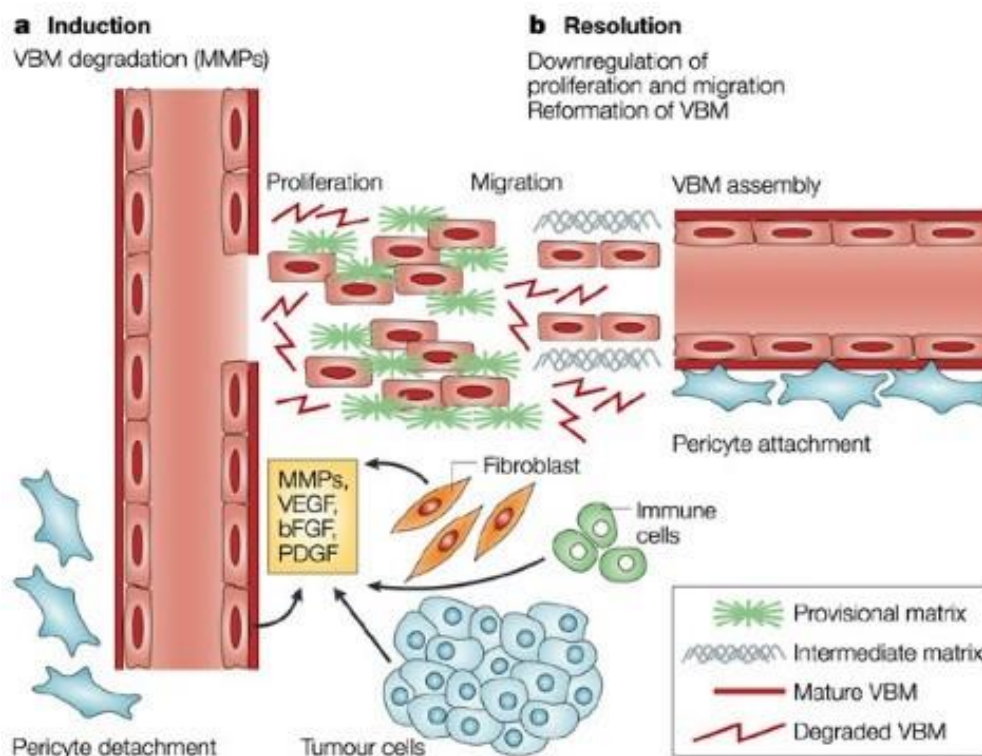


Figura 1.11 Regulación de la migración y proliferación celular mediada por la degradación/formación de la membrana basal vascular. Proceso inducido por las metaloproteinasas de matriz.

3.7 Polimorfismos de VEGF, VEGFR-1 y bFGF

Los polimorfismos genéticos (SNPs) representan uno de los posibles mecanismos que pueden alterar el nivel de expresión de los genes. Los SNPs son variaciones habituales de las secuencias de un gen presentes en la población general y que no son consideradas patogénicas, aunque pueden predisponer al desarrollo de determinadas enfermedades.

Cuando el polimorfismo afecta a la secuencia codificante de nucleótidos puede suponer un cambio en la proteína codificada y alterar su función, mientras que su presencia en zonas no codificantes, especialmente en el promotor, puede suponer la modificación del procesamiento del mRNA y sus niveles de expresión.

Son numerosas las asociaciones encontradas entre polimorfismos y alteraciones en el patrón de expresión génica. Por ejemplo, la inserción de una guanina en el promotor del gen de la metaloproteinasa 1 (MMP-1) crea un sitio de unión para el factor de transcripción AP-1, alterando su nivel de transcripción. Este polimorfismo se ha asociado con metástasis en nódulos linfáticos en pacientes con cáncer y se puede considerar un marcador de progresión (210) .

Esta asociación también ha sido establecida para genes angiogénicos. Así, se han descrito polimorfismos en los genes bFGF, VEGFR1 y VEGFA con la consecuente modificación en sus niveles de expresión. Análogamente, los niveles presentes en suero de factores proangiogénicos como sVEGF y bFGF, se relacionan con la progresión de la enfermedad (211).

De hecho, el estudio de estos polimorfismos relacionados con la modificación de la expresión de los factores proangiogénicos en la LLC-B, resulta particularmente interesante puesto que el conocimiento del patrón génico de un paciente dado puede mejorar el proceso de adopción de decisiones clínicas vinculadas al tratamiento.

Tal y como se ha descrito anteriormente, el cómputo de los valores de expresión del receptor VEGFR1 soluble (sVEGFR1) y de VEGF, puede ser determinante en la progresión de la enfermedad. En el caso del gen VEGFR1, existe un polimorfismo en la

región promotora a 710 bp del codón de inicio de la transcripción (C/T) relacionado con la expresión de VEGFR1 soluble (sVEGFR1). Este polimorfismo forma parte del sitio de unión para p53, gen supresor de tumores que actúa sobre diversos genes involucrados en procesos angiogénicos. Así, p53 estimula la transcripción de VEGFR1 cuando se une al sitio de unión en el promotor. No obstante, tal y como se ha observado en estudios experimentales sobre líneas celulares, esta estimulación se produce únicamente si el nucleótido involucrado en el polimorfismo es T. Por el contrario, cuando la T se sustituye por una C se produce la inhibición de la transcripción (212, 213). La unión de p53 al promotor del gen VEGFR1 (genotipo T) activa su transcripción, incrementando los niveles de receptor soluble (sVEGFR1). Éste ejerce un papel protector bloqueando la unión de VEGF al receptor anclado a la membrana, que presenta actividad tirosina quinasa y que, por tanto, inicia una cascada de señalización.

Otros polimorfismos funcionales presentes en secuencias reguladoras de estos genes están relacionados con su nivel de expresión y, en consecuencia, juegan un papel importante en la salud, especialmente en el caso de grandes reguladores como p53, que juegan un papel directo en el desarrollo del cáncer (214).

Por su parte, dado que niveles elevados de expresión bFGF están relacionados con un mal pronóstico de LLC, pueden resultar de utilidad ampliar el conocimiento sobre sus polimorfismos. De hecho, Schulz y colaboradores describieron en el año 2005 un polimorfismo en posición 223 C/T 5'UTR del gen asociado a variaciones en su expresión (215).

Así, el conocimiento sobre el genotipo concreto de cada paciente para los genes *bFGF*, *VEGFR1* y *VEGF*, podría proporcionar información útil en el manejo del paciente. Considerando la simplicidad del análisis genético y la facilidad con que podría ser incorporado a la práctica clínica habitual, su determinación podría mejorar el proceso de adopción de decisiones relacionadas con el régimen terapéutico de elección.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

La leucemia linfática crónica B es un síndrome linfoproliferativo caracterizado por el acúmulo progresivo y la proliferación de linfocitos B monoclonales como consecuencia de la interacción con diversos componentes celulares de su microambiente. Su curso evolutivo es muy heterogéneo y se caracteriza habitualmente por el ascenso progresivo de la cifra de linfocitos, la aparición de adenopatías y la invasión creciente de la médula ósea que condiciona la aparición de citopenias. Aproximadamente la mitad de los pacientes presentan un curso indolente, con una escasa o nula necesidad de tratamiento y una supervivencia prolongada. En contraposición, la otra mitad experimenta una progresión clínica de la enfermedad con necesidad continua de tratamiento, desarrollo de quimiorresistencia y un pronóstico ominoso. La migración y extravasación de los linfocitos neoplásicos en los diversos territorios está mediada por diversos sistemas, entre los que destacan los factores proangiogénicos como VEGF/VEGF-R y los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR7. Al igual que en la mayoría de los tumores sólidos, la angiogénesis podría tener una clara implicación en la progresión de la enfermedad, facilitando la diseminación tumoral e induciendo un efecto antipoapoptótico/proliferativo directo que contribuyera a la expansión tumoral. Esta tesis doctoral pretende analizar la contribución de la ruta VEGF/VEGF-R a la progresión de la LLC-B a través de la expresión de los tres tipos de receptores de VEGF en células primarias de pacientes, así como el papel de la ruta en la apoptosis y la migración celular de las células neoplásicas de la LLC-B. La caracterización de las potenciales rutas de señalización implicadas puede contribuir a la identificación de dianas moleculares claves que pudieran ser abordadas en el tratamiento de estos pacientes. La asociación de una expresión diferencial de receptores o de la capacidad antiapoptótica y migratoria con un perfil determinado de pacientes podría favorecer la identificación de subgrupos de pacientes candidatos a terapéuticas específicas. Asimismo, el estudio de los polimorfismos genéticos de dicha ruta podría contribuir a ampliar el conocimiento de los mecanismos básicos que favorecen la aparición de la enfermedad y su potencial implicación en la progresión tumoral.

2. Objetivos

El objetivo general del presente estudio es analizar la expresión de los receptores angiogénicos de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) y estudiar su implicación en los procesos de apoptosis y migración celular en células primarias de pacientes con LLC-B. El análisis en grupos de pacientes con diferentes características biológicas puede esclarecer los mecanismos básicos implicados en la progresión de la enfermedad.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1 Analizar la expresión de los receptores angiogénicos de VEGF: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1), VEGFR-3 (Flt-4) en pacientes con LLC-B y su correlación con las características clínico-biológicas y la supervivencia.

2.1.2 Estudiar el papel de la vía VEGF/VEGF-R en la apoptosis y migración celular de la LLC-B. Correlación con la expresión de MMP9, CXCR4, CCR7 y CD49d. Asociación con las características clínicas y pronóstico.

2.1.3 Estudiar los polimorfismos genéticos rs111458691 del gen *VEGFR1*, rs3025039, rs833052, rs1109324 y rs1547651 del gen *VEGF* y el polimorfismo rs1449683 del gen *bFGF* y su impacto clínico en la LLC-B.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes

1.1 Características clínico biológicas

Se incluyeron 230 pacientes diagnosticados de LLC-B en nuestro servicio entre Mayo del 2007 y Junio del 2014, en los que se disponía de material biológico óptimo para el estudio. El material biológico utilizado en este estudio fue sangre periférica y/o médula ósea de pacientes diagnosticados de LLC-B según los criterios de la OMS/IWCLL y las muestras fueron recogidas y procesadas desde mayo del año 2007 hasta el 2015.

El diagnóstico clínico de todos los pacientes se basó en criterios morfológicos e inmunofenotípicos estándar. El conjunto de las muestras empleadas procedían en su mayoría del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Un mínimo porcentaje procedía de otros Hospitales de la Comunidad Valenciana y que habitualmente remiten muestras para diagnóstico y en los que se disponía de un seguimiento adecuado de la enfermedad.

El estudio incluido en este trabajo se realizó en el laboratorio de Hemato-Oncología molecular y celular (Instituto de Investigación sanitaria INCLIVA) y en el Servicio de Hematología-Oncología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Los pacientes dieron su consentimiento informado para la autorización del empleo de las muestras en estudios clínicos e investigación (documento adjunto). Dicho documento previamente fue aprobado por el Comité Etico de Investigación Clínica del Hospital, siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki.

El grupo control estuvo compuesto por 476 individuos procedentes de donantes de sangre voluntarios del Hospital Clínico de Valencia y bolsas de *buffy coats* de donantes sanos anónimos provenientes del centro de Transfusión del Hospital General de Valencia,.

Los criterios de inclusión de los pacientes con LLC-B fueron:

- Edad superior a 18 años.

- Diagnóstico de LLC-B en base a los criterios de la OMS/IWCLL
- El porcentaje de linfocitos B neoplásicos fuera superior al 80% de la población linfoide (216) (217).

Criterios de inclusión para el grupo control:

- Edad superior a 18 años.
- Recuentos hemoperiféricos normales, incluyendo cifras de hemoglobina, plaquetas, leucocitos y contaje diferencial.
- Ausencia de hepatopatía, nefropatía o procesos cancerígenos actuales o pasados siguiendo las recomendaciones del *International Federation of Clinical Chemistry*.

1.2 Procesado de las muestras

La extracción de las muestras de sangre periférica se realizó por punción venosa en región antecubital. Posteriormente fueron recogidas en un tubo con EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer), siguiendo las recomendaciones del *International Council for Standardization in Haematology* (218). Las muestras de MO fueron obtenidas en el momento del diagnóstico mediante punción esternal o de cresta ilíaca postero-superior.

En todos los casos, las muestras extraídas fueron usadas para obtener células mononucleadas (PBMC) por gradiente de centrifugación en Ficoll-Hypaque, técnica basada en las diferencias de densidad de los distintos componentes de la sangre (eritrocitos, PBMCs y suero) (219). Para ello, se depositó la sangre periférica anticoagulada y diluida en proporción 1:3 en Lymphoprep™ (Axis-Shield Poc AS., Oslo, Noruega) y se realizó una centrifugación a 800g durante 20 minutos a 4°C sin freno. Una vez recogida y aislada la fracción mononuclear (linfocitos y monocitos), se diluyó con PBS y se realizó una segunda centrifugación a 250g durante 10 minutos, decantando el sobrenadante y realizando un segundo lavado. Por último, se resuspendió el pellet celular en medio de cultivo o en PBS.

Posteriormente, los linfocitos B fueron purificados con separación magnética mediante anticuerpos (Dynabeads CD3[®] de Invitrogen). La selección CD19 se confirmó mediante CMF resultando una pureza del 95%. Seguidamente, las muestras, tanto células totales como los linfocitos B purificados, fueron criopreservadas para posteriores estudios en nitrógeno líquido (N₂) con un 90% de suero bovino fetal (SBF) y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) hasta su utilización. En este trabajo, se utilizó tanto material fresco como material almacenado congelado en nitrógeno líquido (N₂).

1.3 Estudio inmunofenotípico, morfológico, citogenético y molecular

1.3.1 Estudio inmunofenotípico

Tras la obtención de las muestras (SP y/o MO, puesto que en la LLC-B la célula leucémica está presente tanto en MO como en sangre periférica, presentando el mismo perfil inmunológico en ambas localizaciones), se llevó a cabo una caracterización inmunofenotípica inicial mediante CMF en aquellas muestras con al menos un 80% de células B CD5+/CD19+, utilizando el citómetro FACScan y FACScalibur (Becton Dickinson). La adquisición de los datos y el análisis se realizó utilizando el software CellQuestPro (Becton Dickinson). En todos los experimentos, se adquirió un mínimo de 10000 células B neoplásicas.

Los AcMos utilizados dirigidos frente a los antígenos de superficie humanos fueron: CD45, CD19, cadena ligera kappa y lambda, CD20, CD23, CD5, CD10, FMC7, CD22, CD11c, CD103, CD38 y CD56 (Becton Dickinson). El protocolo de estudio inmunofenotípico de la LLC-B precisa la combinación de varios marcadores inmunológicos que permita su adecuada distinción de otros síndromes linfoproliferativos. Por ello, se utilizó una batería de AcMos conjugados con diferentes fluorocromos que permiten el diagnóstico diferencial de la LLC.

Protocolo de laboratorio:

Para el marcaje se utilizaron 100 µl de muestra de SP completa o médula y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT) en oscuridad con 10 µl del

correspondiente anticuerpo en cada caso. A continuación, se procedió a la lisis de los hematíes mediante incubación durante 10 minutos a RT con una solución lisante comercial (FACS Lysing solution de Becton Dickinson) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras el lavado de las células con PBS, se resuspendieron en 500 µl de PBS.

La LLC-B tiene un perfil inmunológico característico que muestra una expresión de marcadores B (CD19, CD22, CD79Beta) con una intensidad inferior a la de los linfocitos B maduros normales de sangre periférica (220). Sin embargo, ningún marcador es absolutamente específico. Por ello, para obtener un diagnóstico fiable, nos basamos en el sistema de puntuación de Matutes (221) de cinco marcadores, valorando su presencia o ausencia y su intensidad de expresión (Tabla 3.1). Una puntuación superior a 3 puntos en dicho score se consideró altamente característica de LLC-B.

	LLC	LPL	TL
Índice LLC	4-5	0-2	0
CD5	++	-/+	Negativo
CD23	++	-/+	Negativo
Slg	Positivo débil	Positivo fuerte	Positivo fuerte
Fmc7	-/+	++	++
CD79b	Débil	Fuerte	Moderado
Ciclina D1	Negativa	Negativa	Débil

Tabla 3.1. Inmunofenotipo diferencial entre LLC y otras leucemias crónicas B. LLC: leucemia linfática crónica, LPL: leucemia prolinfocítica, TL: tricoleucemia. Slg: Inmunoglobulinas de superficie. ++: positiva en >75 %, +/-: positiva en 10-25%. Adaptado de Matutes E. (222).

Las muestras se procesaron rápidamente a las pocas horas de la extracción, dado que la temperatura podría influir sobre la viabilidad celular y la expresión antigénica, alterando de esta manera las poblaciones celulares.

Como control de calidad interno, realizamos un proceso de calibración, tanto del citómetro de flujo FACScan (Beckton Dickinson) en el cual se enfoca ópticamente el láser y se mide su potencia, así como la calibración de las muestras utilizando sangre periférica para ajustar la autofluorescencia natural de las células sanguíneas.

1.3.1.1 Estudio del antígeno de superficie CD38

CD38 es una glicoproteína de membrana tipo II con expresión variable. Para todas las muestras con LLC-B, se analizó su expresión mediante CMF, considerando positividad cuando al menos un 20% de las células expresaban CD38 (38).

1.3.1.2 Determinación de Zap-70

La proteína Zap-70, miembro de la familia tirosin-kinasa que normalmente se expresa en células T y NK, se determinó por CMF, siguiendo el protocolo de Crespo y cols (28) modificado.

Básicamente, las PBMC fueron fijadas y permeabilizadas usando el kit intraStain (Dako) y posteriormente incubadas con 1.5 µg de anticuerpo anti-Zap, clon 2F3.2 (Upstate) o control isotópico: anti-Mouse IgG2a, clon GC270 (Chemicon) durante 20 min a RT, seguido de lavados y tinción con anticuerpo anti Mouse Fab'2-FITC (Dako) durante 20 minutos, a RT y en oscuridad. A continuación se realizaron nuevos lavados y se incubaron las muestras durante 10 minutos a 37°C con suero normal de ratón al 20%, seguidas de lavado e incubación final con los anticuerpos CD3- PE, CD56-PE y CD19PerCP (BD Biosciences), durante 10 minutos adicionales en oscuridad. Posteriormente se procedió a un nuevo lavado y lectura en un citómetro Cytomics F500 (Beckman Coulter). El análisis de las muestras se realizó usando el programa Cytomics CXP (Beckman Coulter). Los análisis se llevaron a cabo sobre la población linfocitaria, excluyendo “debris”, dobletes o monocitos. Se realizaron gráficos biparamétricos para cuantificar la expresión de Zap70 en la población T y NK (tinción con CD3+ y CD56+)

y en la población B (CD19+). El control isotópico se utilizó como control de negatividad. Los resultados $\geq 20\%$ se consideraron positivos.

1.3.2 Estudio morfológico

El estudio morfológico de sangre periférica se realizó mediante la tinción de May-Grunwald-Giemsa y en ella se constató la presencia de linfocitos de aspecto maduro, cromatina condensada en grumos, citoplasma agranular y escaso, y la presencia de las características sombras de Gümprrecht producidas por la rotura mecánica de las células al realizar la extensión. También se analizó la presencia de linfocitos con hendiduras nucleares (linfocitos hendidos) y nucléolos (prolinfocitos).

1.3.3 Estudio citogenético

El estudio citogenético convencional consistió en el análisis de las alteraciones cromosómicas presentes en las metafases de las células leucémicas obtenidas tras el cultivo *in vitro* de células de SP y/o MO.

Se procesaron las muestras para la realización del bandeo G a partir de cultivos celulares de 72 horas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibiótico al 1%. Los cultivos se prepararon en cámara de flujo laminar y posteriormente fueron incubados toda la noche en condiciones de 37°C, 5% de presión de CO₂ y una humedad del 90%. Tras el cultivo, se realizó el cosechado añadiendo 100 μ L de colcemid y dejándolo actuar 30 minutos a 37 °C, impidiendo así la formación del huso acromático.

Para la recolección de los cromosomas se transfirió el cultivo a un tubo cónico, se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, decantándose el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento a continuación. Para aumentar el volumen de las células, se añadieron 10 ml de CIK previamente atemperado y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se realizó la fijación mediante la disolución de Carnoy (metanol: ácido acético en proporción 3:1), vertiéndose gota a gota el fijador hasta 5 ml, se centrifugó, se decantó y

se resuspendió el botón celular. Para la preparación de las extensiones, se vertió una gota de suspensión celular sobre un portaobjetos desengrasado previamente en metanol frío. Las preparaciones una vez se dejaron secar al aire y en llama, se incubaron toda la noche en horno a 60 °C envejeciendo y quedando las metafases aptas para seguir con la tinción de las bandas G.

Los cromosomas fueron identificados mediante el método de bandas G con tripsina-Giemsa (223), basado en una digestión enzimática con tripsina y una tinción con una solución de Giemsa (47,5 mL fosfato monopotásico + 47,5 mL fosfato bisódico + 5 mL de Giemsa) durante 5 minutos. Por último se lavaron y se dejaron secar toda la noche.

El análisis del cariotipo se realizó mediante un microscopio Nikon Eclipse E600 (Tokyo, Japón) y con el programa Ikaros (Metasystems Inc, Alemania). Se analizaron al menos 20 metafases por muestra para aceptar un cariotipo como normal, designando aquellas anomalías cromosómicas presentes en los cariotipos con alteraciones con la nomenclatura definida en varias convenciones de expertos recopiladas en el ISCN (224).

Para confirmar específicamente la presencia de ciertas alteraciones citogenéticas propias de la LLC que generalmente son difíciles de detectar debido, por un lado, a la resolución obtenida en la citogenética de rutina, sumado a las dificultades en la obtención de metafases por la baja actividad mitótica de las células B malignas, se empleó la técnica de hibridación in situ mediante sondas de ADN marcadas con fluorescencia (*FISH*). Las principales sondas utilizadas se describen en la tabla 3.2.

Sondas <i>FISH</i>	Región	Cromosoma
LSI ATM	11q22 (ATM)	11
LSI Tp53/CEP 17 D17Z1	17p13 (p53) +Centromérica	17
CEP 12	Centromérica	12
D13S319/13q34	13Q14.3 + 13Q34 (LAMP1)	13
LSI IGH	14q32 (IgH)	14
LSI MYB	6q23	6

Tabla 3.2 Panel de sondas comerciales específicas (*Vysis/Abbott Co, Downers Grove, IL, USA*) utilizadas en el estudio de *FISH* para detectar la presencia de anomalías cromosómicas más prevalentes en los pacientes con LLC-B.

1.3.4 Estudio molecular

1.3.4.1 Estado mutacional de la región variable del gen de las inmunoglobulinas IgVH

Se extrajo ADN genómico a partir de muestras de células mononucleares utilizando *GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron amplificaciones por PCR de los genes de IgVH siguiendo los protocolos descritos por Matthews y cols. (225). Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la tabla 3.3).

Las condiciones para la amplificación por PCR fueron las siguientes: 35 ciclos de desnaturalización a 95°C 15 segundos, hibridación a 60°C 15 segundos, extensión a 72°C 1 min y elongación final a 72°C. Se usaron los siguientes reactivos: cebadores del protocolo Biomed 2139 y cebadores correspondientes a la región líder 140 a una concentración 0.2 µM, 500 ng de ADN, 2 U de Taq ADN polimerasa Platinum (New England Biolabs) y 1.5mM de MgCl₂.

Cebadores específicos de familia (región FR1) (sentido)

VH1-FR1 5' GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG 3'
 VH2-FR1 5' GTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCC 3'
 VH3-FR1 5' CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG 3'
 VH4-FR1 5' CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG 3'
 VH5-FR1 5' CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT 3'
 VH6-FR1 5' TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG 3'

Cebadores correspondientes a la región líder (sentido)

VH1 5' TCACCATGGACTGGACCTGGAG 3'
 VH2 5' ATGGACATACTTTGTTCCACGCTC 3'
 VH3 5' CCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGG 3'
 VH4 5' ACATGAAACAYCTGTGGTTCTTCC 3'
 VH5 5' ATGGGGTCAACCGCCATCCTCCG 3'
 VH6 5' ATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTTC 3'

Cebadores consenso (antisentido) 137,139

JH consensus 5' CTTACCTGAGGAGACGGTGACC 3'
 JH consensus 2 5' ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGT 3'

Tabla 3.3 Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación del gen IgVH.

Una vez purificados los productos de PCR, se realizó la secuenciación directa de ambas cadenas. Las secuencias de IgVH se alinearon con las de la línea germinal más cercana usando las bases de datos BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>), V-Base (<http://vbase.mrc-pe.cam.ac.uk/>), IMGT (http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest). Se consideraron mutadas aquellas secuencias con una desviación >2% de la secuencia germinal. En el caso de encontrar homologías cercanas al 98% se realizó una nueva secuenciación usando cebadores correspondientes a la región líder.

Características LLC-B	Genes IgVH No Mutados	Genes IgVH Mutados
Mutaciones gen VH	pocas o ninguna	un número significativo
Expresión de CD38	alta	baja
Expresión de ZAP-70	alta	baja
Retención de la señalización por BCR	sí	no
Necesidad de tratamiento	común	poco común
Edad de presentación	sin diferencias	sin diferencias

Tabla 3.4 Subgrupos principales en los que se divide la LLC-B en función de la presencia o ausencia de mutaciones en los genes de las cadenas variables de las Ig (226).

2. Estudio de los receptores angiogénicos de VEGF y MMP-9

2.1 Niveles de expresión de superficie de VEGF-R1, VEGF-R2 y VEGF-R3

El análisis de expresión de los tres receptores del VEGF en la superficie celular se realizó mediante CMF con la aplicación de AcMos conjugados con los fluorocromos FITC, PE y PerCP, combinando este marcaje con el fin de obtener una buena discriminación de la población tumoral y detectar la positividad e intensidad de expresión para cada receptor. Para ello, el AcMo CD19 se incluyó sistemáticamente en todos los tubos, así como un control isotópico.

La adquisición se realizó en el citómetro de flujo *FACScan* (*Becton Dickinson*) y el programa utilizado fue *CellQuest* (*Becton Dickinson*). Se adquirieron 20.000 eventos para todos los tubos analizados. El programa *Paint-A-Gate Pro* (*Becton Dickinson*) se utilizó para el análisis de los datos aportando información cualitativa (presencia del epítipo del antígeno en la célula) y cuantitativa (nivel de expresión, en términos de número de moléculas por célula).

El proceso de análisis se basó en la discriminación de las distintas poblaciones en el histograma FSC/SSC, tras excluir las células de desecho y los agregados, y en el análisis de las positividades de los distintos AcMos e intensidad de expresión representado tanto por la Intensidad de fluorescencia media (IMF) como por el % de número de moléculas de un antígeno expresadas en cada célula.

Se realizó el mismo procedimiento para el grupo control de individuos sanos.

2.2 Expresión intracelular de MMP-9 y VEGF

La cuantificación de la expresión intracelular de MMP-9 y VEGF se realizó mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente pero con una fijación y permeabilización previa de la membrana celular mediante el uso del kit *intrapPrep* (Beckman Coulter). Los AcMos intracitoplasmáticos utilizados fueron MMP-9-FITC y VEGF-PE de R&D, usando como controles isotópicos IgG1-PE y IgG2b-FITC.

El protocolo realizado fue el siguiente:

1. Dispensación de 50 µl de muestra en tubos de polipropileno de 12x75 mm.
2. Adición de 10 µl del anticuerpo monoclonal.
3. Mezcla e incubación durante 15 minutos a RT y oscuridad.
4. Adición de 100 µl del Reactivo *IntraPrep™ Reagent 1* (fijador).
5. Agitación de cada tubo con el vórtex durante unos segundos.
6. Incubación durante 15 minutos a RT (18-25°C) y en oscuridad.
7. Adición de 2 ml de PBS-BSA y centrifugación durante 5 minutos a 300g.
8. Desecho del sobrenadante por aspiración.
9. Adición de 100 µl del Reactivo *IntraPrep™ Reagent 2* (permeabilizador).
10. Agitación suave sin vórtex e incubación durante 5 minutos a RT y oscuridad.
11. Adición de 10 µl del anticuerpo intracelular y agitación suave de 1 a 2 segundos.
12. Incubación durante 15 minutos a RT y en oscuridad.

13. Resuspensión en 2 ml de PBS-BSA y centrifugación durante 5 minutos a 300g.
14. Desecho del sobrenadante por aspiración y resuspensión en 1 ml de PBS.

3. Técnicas de ELISA empleadas en la cuantificación del nivel sérico de VEGF

El suero de 40 pacientes con LLC-B se obtuvo mediante centrifugación de los tubos de extracción de sangre sin anticoagulante a 1000g durante 15 minutos. El suero se congeló a -80°C hasta la detección del VEGF mediante técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Este ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, se basa en la detección de un antígeno inmovilizado mediante anticuerpos sobre una fase sólida, que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto puede ser medido por espectrofotometría. Para la medición de los niveles de VEGF en suero, se utilizó el kit *Quantikine Elisa Human Vegf de R&D Systems*, siguiendo el procedimiento descrito por la casa comercial. Se realizó una curva estándar a partir de una concentración de 2000pg/ml de VEGF presente en el kit empleado. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, realizando de las muestras por duplicado. Finalmente, se determinaron los valores obtenidos mediante una lectura a 450 nm por espectrofotometría.

4. PCR cuantitativa en el análisis de expresión de VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3 y bFGF

Se analizó mediante PCR cuantitativa el nivel de expresión de los genes VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3 y bFGF a partir de linfocitos B de 32 pacientes con LLC-B. Como controles se utilizaron los linfocitos B de 30 donantes sanos. Los ensayos se realizaron por triplicado presentando variaciones inferiores al 5%. La cuantificación se realizó mediante el kit *Gene Expression Assays (Applied biosystems)* con la utilización de sondas Taqman (Tabla 3.5).

	Referencia secuencia	Tamaño del amplicón	Exones	HS A.Biosystems
VEGF-R1	NM_002019.4 GI:229892268	55	17-18	Hs00176573
VEGF-R2	NM_002253.2 GI:195546779	84	15-16	Hs00176676
VEGF-R3	NM_002020.4 GI:189083693	88	23-24	Hs00153458
GAPDH	NM_002046.4 GI:378404906	122	42066	Hs99999905
bFGF	NM_002006.4 GI:153285460	82	42036	Hs00266645

Tabla 3.5 Información de las sondas TaqMan utilizadas en los ensayos de PCR cuantitativa (RTqPCR).

5. Cultivos celulares

Tanto la manipulación de las líneas celulares y los linfocitos B neoplásicos de pacientes, como la preparación de las soluciones necesarias para su mantenimiento se realizaron en campanas de flujo laminar en condiciones de esterilidad, con el fin de minimizar el riesgo de contaminación. El mantenimiento y la limpieza de la campana y del material de trabajo se realizaron con etanol al 70% antes y después de su uso y bajo irradiación UV.

5.1 Condiciones de los cultivos celulares

Todos los medios de cultivo utilizados fueron suplementados con 10% de SBF (suero bovino fetal inactivado a 56°C durante 30 min.; Gibco) y 1% de antibiótico PE (Penicilina-Estreptomicina, 10.000 µg/ml; Gibco). Para los cultivos de células neoplásicas de pacientes con LLC-B se utilizó como medio basal RPMI 1640 con glutamina 2 mM (Gibco). Todos los medios de cultivo suplementados y preparados para su uso se mantuvieron a 4 °C, atemperándose en baño a 37 °C antes del uso.

Cada línea celular empleada fue mantenida con su medio correspondiente en el incubador con atmosfera húmeda a 37°C y con 5% de CO₂ (Haraeus BB6060, Jouan IG 150). Para la realización de subcultivos se emplearon frascos de cultivo ventilados. En la realización de los sucesivos pases celulares, se recogieron las células en suspensión transvasándolas a tubos de cultivo, seguido de una centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos a RT. Tras decantar el sobrenadante, se realizaron dos lavados con PBS al pellet celular obtenido. Posteriormente, el sedimento celular se resuspendió con nuevo medio pasándolo a nuevos frascos de cultivo dejando crecer el cultivo celular en el incubador, teniendo en cuenta el número de pases realizados.

Para la realización de los subcultivos de las líneas celulares utilizadas que crecen adheridas al sustrato (HK, NKtert, Huvec) se requirió un procesado diferente. El protocolo consistió en el lavado de las células con PBS y la adición de 3ml de tripsina-EDTA (por frasco de T25), incubándose 5 minutos a 37°C hasta la observación en el microscopio invertido del despegue de las células. Seguidamente, se procedió a la inactivación del efecto de la tripsina con la adición de SBF y se realizaron sucesivos lavados hasta que finalmente las células volvieron a ser incubadas con nuevo medio y frasco de cultivo.

5.2 Congelación-descongelación

Debido al envejecimiento de las líneas celulares a medida que se subdividen y a la consecuente pérdida de sus características morfológicas, bioquímicas y moleculares, se fueron criopreservando las células que se encontraban en pases iniciales en N₂ con la intención de almacenarlas durante largos periodos de tiempo. Para ello, se emplearon crioviales y medio de congelación, compuesto por un 90% de SBF y 10% de DMSO como crioprotector, puesto que evita que se formen cristales en la célula durante el proceso de congelación.

Con carácter previo a la congelación, las células fueron contadas en un microscopio óptico utilizando una cámara de Neubauer, calculando la dilución necesaria para que cada criovial que contuviera entre 0.5-15 x 10⁶ células/ml (según la línea celular).

Una vez obtenido el número de células correspondiente en cada criovial, se guardaron en cajas especiales de congelación con isopropanol durante 48h a -80°C , para evitar que la congelación se produjera bruscamente. Tras este periodo, se guardaron las muestras definitivamente en N_2 (-195°C).

El proceso de descongelación se realizó de manera rápida, con el fin de limitar el tiempo de exposición de las células el menor tiempo posible al DMSO a RT. El criovial congelado se transfirió del N_2 al baño a 37°C , rociándose con etanol previamente. Seguidamente, se resuspendió el contenido de la alícuota en 6ml de medio de cultivo en tubos de 15ml y se procedió a la centrifugación durante 5 minutos a 1500 rpm. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, desechando de esta manera el DMSO de las células y se resuspendió el botón celular en medio de cultivo fresco.

Una vez determinado el número de células viables presentes mediante la tinción con Trypan Blue (tinte vital que tiñe específicamente las células muertas) y realizado el contaje celular, las células se sembraron en frascos T25, T75 o T150 dejándolas crecer en el incubador de CO_2 .

5.3 Líneas celulares utilizadas

- **MEC-1:**

La línea Mec-1 se estableció en 1993 a partir de sangre periférica de un paciente de 61 años de edad con LLC-B (transformación prolinfocítica a PLL-B). Las células crecen en suspensión, solas y formando pequeños agregados. Presentan una morfología polimórfica. Algunas pocas células son ligeramente adherentes.

Medio de cultivo: 90% Iscove's MDM (Gibco) + 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco). Incubación a 37°C con un 5% de CO_2 .

Subcultivo: 1:2-1:3 cada 2-3 días, siendo el tiempo de doblaje celular de 40h. Siembra $0,5 \times 10^6$ células/ml. Durante la primera semana después de la descongelación las células deben mantenerse con un 20% de SFB.

Inmunología: CD3 -, CD10 -, CD13 -, CD19 +, CD20 +, CD34 -, CD37 +, CD38 +, cyCD79a +, CD80 +, CD138 +, HLA-DR +.

Citogenética: Cariotipo con 10% de poliploidía: 46(44-47)<2n>XY, -2, +7, -12, +1-2mar, t(1;6)(q22-23;p21), add(7)(q11), der(10)(10pter->q22:2q11->qter), del(17)(p11)

Virus: PCR: EBV +, HBV -, HCV -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -

Adquirida en *Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig*, Alemania (DSMZ, código ACC 497).

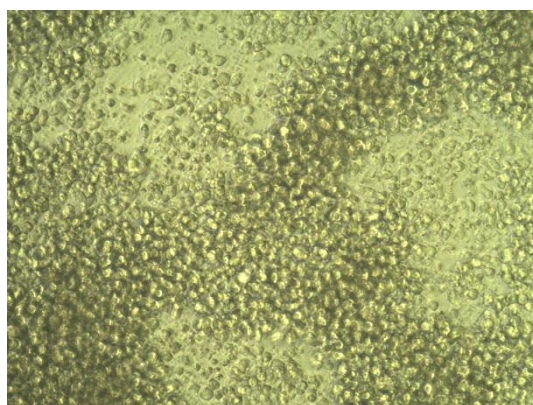


Figura 3.1 Morfología de la línea celular MEC1 (227).

Línea celular	Marcadores de membrana	FISH/Cariotipo	Autenticidad	CD38	ZAP-70
MEC1	IgM,κ/CD5- /CD19+	12-,17p- ⁴	IGHV: línea=sangre paciente	40%	2%

Tabla 3.6 Características de la línea celular MEC1 (227).

- **NKTert:**

Línea celular humana derivada de células estromales de MO inmortalizadas con la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT). Adquirida en el banco celular japonés *RIKEN Cell Bank (BioResource Center, Sapporo)*; Referencia RCB2350. Útil para propagar las células madre hematopoyéticas. Su morfología es fibroblástica. Son células adherentes.

Medio de cultivo: *Alpha-minimum essential Eagle* (α -MEM; Invitrogen) suplementado con sales Earl y L-glutamine, 12.5% FBS (HyClone), 12.5% suero humano HS (Cellgro), 1 μ M Hidrocortisona (Sigma-Aldrich), y 0.1mM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).

Subcultivo: una vez a la semana. Ratio de división celular: 1:8.

Características generales de NKTert (118)

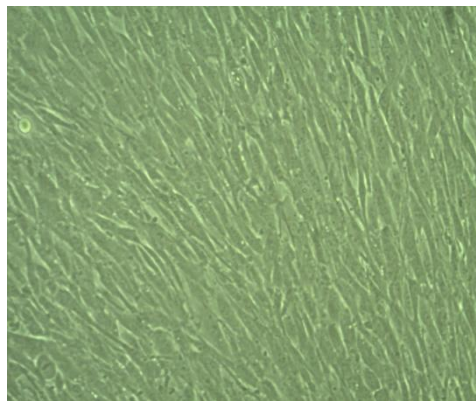


Figura 3.2 Morfología de la línea celular NKTert.

- **HUVEC:**

Células endoteliales vasculares adquiridas en *American Type Cell Culture* (ATCC® CRL-1730™) que crecen adherentes con morfología endotelial.

Medio cultivo: EBM-2.500ml Lonza CC-3156 suplementado con *EGM-2 SINGLE QUOTS* CC-4176+10% SBF+1%PE.

Subcultivo: Ratio de 1:2 a 1:3, renovando el medio de 2 a 3 días por semana.

Referencia HUVEC (228, 229)

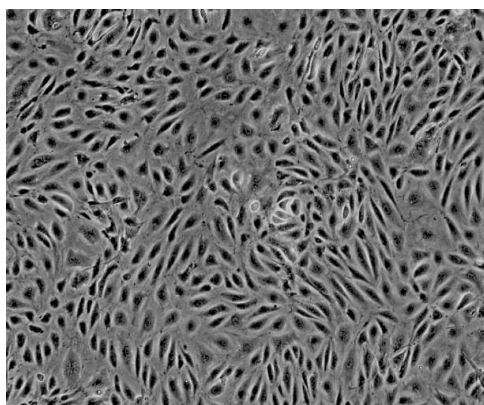


Figura 3.3 Morfología de las células endoteliales vasculares HUVEC.

- **HK:**

Células dendríticas foliculares. Las células crecen adheridas al sustrato.

Medio cultivo: RPMI 1640 suplementado con 10% SBF, 1 % antibiótico PE y 4mM L-glutamina.

Subcultivo: Ratio de 1:3, tripsinizando las células a los 3 a 4 días, cuando están confluentes.

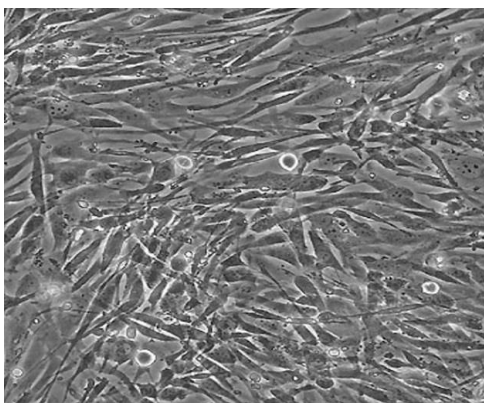


Figura 3.4 Morfología de las células dendríticas foliculares HK.

5.4 Sistema de co-cultivo celular

Para el análisis de la apoptosis inducida por los inhibidores estudiados se realizó un cultivo de células LLC-B de forma aislada en medio líquido y otro sistema de co-cultivo con línea estromal y con células dendríticas foliculares (147). Con este sistema de co-cultivo se pretendió reproducir parcialmente las interacciones de las células *in vivo* y así poder obtener un mejor conocimiento de la implicación del microambiente celular (230), en el desarrollo de la enfermedad.

Se utilizaron, diversos sistemas de cultivo celular para poder abordar los diferentes objetivos de este trabajo. Por ello, a continuación se describe cada técnica empleada en el estudio de cada objetivo, respectivamente:

5.4.1 Estudio del efecto de la vía VEGF/VEGF-R sobre la apoptosis y migración celular de las células B en la LLC

5.4.1.1 Citometría de flujo en el estudio de apoptosis celular

Para el cálculo de la viabilidad celular de las líneas celulares empleadas, de las células primarias de pacientes LLC-B y de las células B de individuos sanos utilizados como controles (a partir de *buffy coats*), se realizó el marcaje celular con 0.5 mg/ml de anexina V conjugada con el fluorocromo FITC y 0.5mg/ml de Ioduro de propidio (PI), incubándose 15 minutos en oscuridad a RT. El cálculo de la unión a anexina que se produce en las células apoptóticas debido a la translocación de los residuos de fosfatidilserina de membrana y la incorporación de PI por la pérdida de integridad de la membrana plasmática se realizó por CMF (FACScalibur- BD), mediante el uso del kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (*BD PharmingenTM*). Según las distintas combinaciones de positividad para la Anexina y el IP (Anexina V y PI negativo: viable; Anexina V positivo y PI negativo: apoptóticas tempranas, presencia de integridad de la membrana; y finalmente Anexina V y PI positivo: apoptóticas tardías y muerte celular), pudimos conocer el estado de apoptosis que presentaba cada célula.

El estudio del efecto sobre la apoptosis celular mediante CMF fue realizado tras la administración de VEGF-165 y diferentes inhibidores de quinasas como Sorafenib (231) (232), implicado en la vía ERK/MAPK, así como SU1498 inhibidor de VEGF-R2, Wortmanin1628 y Lys294002 como inhibidores de PI3K/AKT, PD98059 inhibidor de MEK P42/44 MAPK, SB203580 como inhibidor de P38 y SP600125 inhibidor de JUNK.

5.4.1.2 Migración celular

Se cultivaron tanto la línea celular Mec-1 y las células primarias de pacientes LLC-B con diferentes características clínicas, fueron cultivadas en placas de 24 pocillos (*Costar, Corning NY*), purificando las células B previamente tal y como se ha descrito en apartados anteriores. Se cultivaron 3×10^6 células en un volumen total de 2ml por pocillo, realizando posteriormente el tratamiento de las células con VEGF-165 (*PrePotech*) a una concentración final de 50ng/ml durante 24h en el incubador, inhibidor VERGFR2/KDR (*Calbiochem SU1498*) a una concentración final de 70nM y en otros pocillos se añadió simultáneamente VEGF-165 exógeno junto con el inhibidor, para potenciar su efecto.

A su vez, se realizó el cultivo de las células endoteliales de cordón umbilical HUVEC en la parte superior de la cámara del *transwell* (Transwell® Permeable Support; Costar NY) durante 24h, hasta obtener una monocapa de confluencia deseada. Para ello, se sembraron 829 células/filtro teniendo en cuenta el diámetro del filtro (diámetro: 6.5mm; $A = \pi \times r^2$). Este método se basa en el sistema de la cámara de Boyden que presenta una membrana de policarbonato de 6.5 mm, con poros de 8 μ m de diámetro, por donde pasan las células hacia la parte inferior del pocillo que contiene el medio con el quimio-atrayente.

En la parte superior del filtro se añadieron 200 μ l de medio y en la parte inferior se agregaron 500 μ l de medio HUVEC suplementado. Pasadas 24h, se añadieron 450 μ l de medio celular RPMI suplementado o medio Mec-1, en función de si se habían utilizado células primarias de pacientes o líneas celulares, en la parte inferior de un pocillo nuevo. Aquellos ensayos estimulados con la quimiocina SDF-1, se añadieron en la parte inferior de los pocillos 50 μ l de las alícuotas de CXCL12 (*Peprotech; London, United Kingdom*)

de concentración 1000ng/ml, obteniendo una concentración final de 100ng/ml en un volumen total de 500µl por pocillo. Se realizó el mismo procedimiento pero sin quimioatrayente en los pocillos sin ningún estímulo, utilizados como controles.

Previamente a la adición de las células neoplásicas tratadas y contadas con cámaras de Neubauer, se eliminó el sobrenadante de la parte superior del filtro del *transwell* que presentaba medio óptimo para el crecimiento de las HUVEC, y se realizaron los lavados de los filtros con PBS. Seguidamente, se añadieron en la parte superior del filtro 5×10^5 /100µl de células leucémicas en suspensión, siguiendo el procedimiento de Till KJ y cols (156), (233) y Redondo y cols (154) con pequeñas modificaciones. Tras 6h a 37°C en el incubador de CO₂, con el fin de que se produjera la trans migración de las células neoplásicas, se recogieron las células migradas presentes en la parte inferior del filtro (176). Posteriormente, se centrifugaron a 1500 rpm 5 min y se procedió al marcaje con los AcMos pertinentes (añadiendo en todos los tubos 10 µl de CD19-FITC de Becton Dickinson), depositando un volumen preciso en tubos de citómetro especiales para el conteo celular *BD Trucount™ tubes*. Durante 15 minutos fueron incubados en oscuridad a RT y por último se añadieron 400µl de PBS para realizar la adquisición de las muestras en el citómetro. La migración celular se determinó por duplicado analizando el número de eventos dentro de la población seleccionada de células B, normales o patológicas.

Fue importante añadir el volumen final exacto en el tubo de adquisición y tener en cuenta el número de bolas fluorescentes de cada tubo *flow count (Trucount absolute count tubes Becton-Dickinson)*, puesto que estos valores son necesarios para realizar posteriormente el cálculo del índice de migración celular (número de células CD19+ que han migrado en presencia de la quimiocina dividido por el número de células CD19+ que ha migrado en ausencia de quimiocina). Los resultados se expresaron como porcentaje de células que han migrado respecto al número de células contadas en la suspensión celular inicial o como índice de migración (MI) (Figura 3.5). Todo el proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad con el empleo de cabina de flujo laminar, hasta la adquisición por CMF.

$$Mi = \frac{\text{células CD19+ migradas}}{\text{beads}} \times \frac{\text{n}^\circ \text{lote beads}}{\text{volumen tubo (ml)}}$$

Figura 3.5 Cálculo del índice de migración. El ratio de migración fue tomado como la media \pm SD. Cuantificamos el MI final con el ratio del MI obtenido con la estimulación con VEGF comparado con los obtenidos en los controles no estimulados, células tratadas con inhibidores frente controles y ambos (VEGF junto con inhibidor de VEGF-R2) frente a células sin tratamiento.

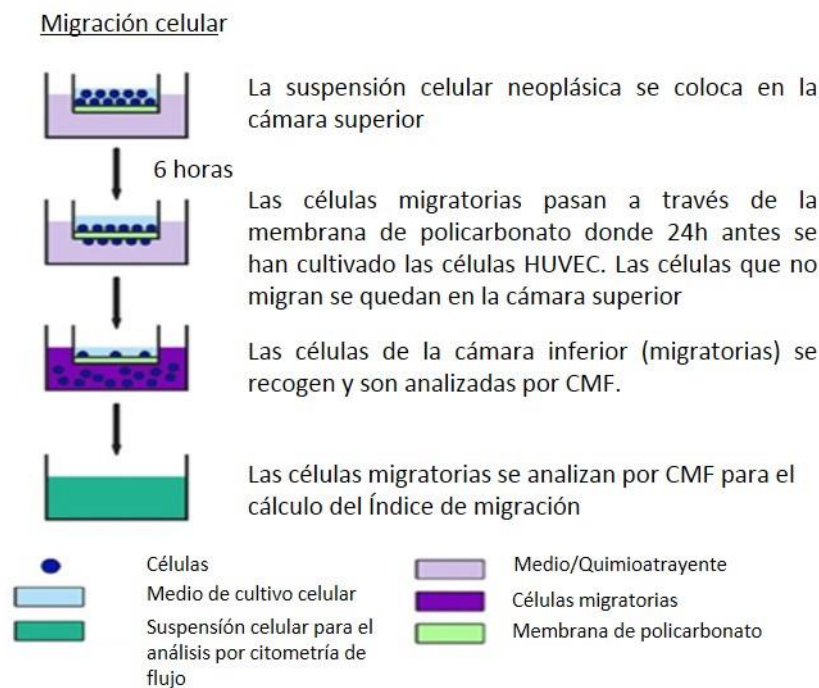


Figura 3.6 Esquema del sistema de la cámara de Boyden para el análisis de la migración celular de las células B neoplásicas.

5.4.2 Análisis de expresión de quimiocinas CXCR4, CCR7 y CD49d

El estudio de expresión de las quimiocinas CXCR4, CCR7 y CD49d se realizó en la suspensión celular expuesta o no al estímulo por VEGF mediante anticuerpos específicos para la detección de las mismas por CMF. Se utilizaron los anticuerpos murinos anti-CXCR4/CD49d/CCR7 conjugados con PE (*R&D Systems, Abingdon, United Kingdom*), CD19 conjugado con FITC y los apropiados controles isotópicos correspondientes para cada tubo. Se emplearon 10µl de cada anticuerpo y 80 µl de PBS, resultando un volumen final de 100 µl. En el citómetro se determinó una lectura conjunta del cálculo del porcentaje de migración celular así como de la expresión de las quimiocinas de las células migradas.

5.4.3 Sistema de cultivo mediante la línea estromal NKTert y células dendríticas HK para el estudio de la apoptosis *in vitro* inducida por inhibidores de quinasa

Se analizó la apoptosis *in vitro* inducida tras la administración de diferentes inhibidores de quinasas mediante la comparación entre la efectividad de los fármacos en diferentes sistemas de cultivo. Se realizó tanto en células en suspensión como en diversos sistemas de co-cultivo para valorar la influencia del microambiente en la apoptosis inducida por los inhibidores.

Para el cultivo de células aisladas de LLC, de las células primarias de pacientes, de las líneas celular que crecen en suspensión (Mec-1) (227), y de las células B controles, se sembraron 2×10^5 células/ml en placas de 24 pocillos, con su medio de cultivo correspondiente. Los cultivos fueron tratados con diferentes inhibidores de MAPK específicos, a diferentes tiempos y concentraciones y/o con VEGF-165. En la tabla 3.7 se muestra el tiempo de exposición de cada tratamiento así como su concentración. Se empleó SU1498 como inhibidor de KDR o VEGF-R2, Wortmanim1628 y Lys294002 como inhibidores de PI3K/AKT, PD98059 inhibidor de MEK P42/44 MAPK, SB203580 como inhibidor de P38, SP600125 inhibidor de JUNK y por último el inhibidor multiquinasa con actividad antiangiogénica Sorafenib (234, 235). Todos los tratamientos disponían de sus respectivos controles de toxicidad con diferentes concentraciones de

DMSO. Así mismo, se realizaron cultivos control (sin ningún estímulo) sometidos a las mismas condiciones que los cultivos tratados.

Para todos los tratamientos y los cultivos control, se realizaron por duplicado lecturas de viabilidad por CMF a las 24, 48 y 72 horas respecto a su control a las 0h.

	Concentración	Tiempo exposición	Casa comercial
Human VEGF 165	50 ng/ml	30min-72h	PrepoTech
VEGF-R2 Tyrosine Kinase Inhibitor	70nM	1h	Calbiochem
Wortmanim 1628	10 mM	1h	Sigma-Aldrich
Lys294002	10 mM	1h	Sigma-Aldrich
PD98059	10 mM	1h	Calbiochem
SB203580	1µg/ml	1h	Calbiochem
SB203580	1µg/ml	1h	Calbiochem
SP600125	50mM	1h-24h	Sigma-Aldrich
BAY43-9006	1-10uM	1h-24h	Selleckchem
BAY 73-4506	1-10uM	1h-24h	Selleckchem

Tabla 3.7 Tratamientos empleados y tiempo de exposición en los ensayos de cultivo celular de la línea Mec-1.

La realización del co-cultivo celular se llevó a cabo con la siembra de la línea celular mesenquimal StromaNK-tert (118) y/o la línea celular derivada de células dendríticas foliculares HK. Para NKTert, se sembraron 1×10^5 células/ml en placas de 24 pocillos hasta lograr confluencia a las 24h, siguiendo el procedimiento de Hamilton y cols (236). Por su parte, para el cultivo de las células HK se sembraron $1,5 \times 10^5$ células/ml. Sobre la monocapa crecida de NKTert se depositaron 2×10^6 cels/ml y 1×10^6 cels/ml sobre las HK, de células leucémicas en suspensión en presencia y/o ausencia de los

estímulos reproduciendo las condiciones *in vivo* del efecto antiapoptótico que ejerce el microambiente.

Posteriormente, se determinó la viabilidad celular midiendo los porcentajes de apoptosis mediante CMF (FACScalibur–Becton Dickinson) siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

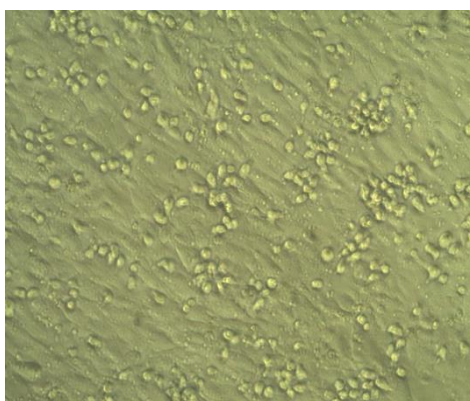


Figura 3.7 Co-cultivo de la línea celular Mec-1 y NKtert.

6. Técnica de microscopía confocal

6.1 Expresión de CXCR4

Para la observación de la cascada de fosforilación de CXCR4 inducida por VEGF, fueron cultivadas 3×10^6 de células de la línea celular Mec-1, células B de pacientes LLC-B con diferentes características biológicas y clínicas y, por último, células de linfocitos B normales (*buffy coats*) en presencia o ausencia (control) de VEGF a una concentración de 50 ng/ ml por pocillo durante 24 horas en el incubador de CO₂ a 37°C. La técnica consistió en los siguientes pasos: lavado, fijación, permeabilización, bloqueo y marcaje con los anticuerpos correspondientes, utilizando cámaras especiales de cultivo óptimas para la observación en microscopio invertido (*Lab-Tek*).

Tras el tratamiento de las células y la comprobación de una buena viabilidad celular (80% aproximadamente) mediante CMF, las muestras fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Seguidamente, se procedió a la fijación de las células mediante paraformaldehído al 3.7% disuelto en PBS durante 30 minutos a RT para evitar la pérdida de células. Posteriormente, fueron permeabilizadas con 0,2% de Triton X-100 disuelto en PBS durante 2 minutos. Las células fueron lavadas con PBS y una vez introducidas dentro de las cámaras, se bloquearon durante 20 minutos a RT con 5% de suero humano diluido en *buffer1* (PBS diluido en 1% de BSA y 0,3% de Triton X-100). Se emplearon placas de 8 pocillos con 500µl de volumen por pocillo.

Seguidamente, se incubaron con anticuerpos primarios anti-CXCR4 y anti-CXCR4 Phospho S339 (Abcam) a una dilución 1/1000 en *buffer1* durante toda noche a 4°C en ambiente húmedo. Las células también fueron marcadas con CD19-PE como control interno de linfocitos B. Por último, tras 3 lavados con *buffer2* (PBS diluido en BSA al 0.25%, Triton X-100 al 0.1%) a 1500rpm durante 10 minutos, se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 647 conejo (Invitrogen) y fluoresceína de cabra IgG anti conejo (Invitrogen) durante 1 hora en oscuridad a RT a una dilución 1/500 en *buffer2*. Tras otros 3 lavados posteriores en *buffer2*, los núcleos se tiñeron con Hoescht 33258 (Invitrogen) a una concentración de 5 mg/100 µl a una dilución 1/1000 con PBS, incubándose durante 10 minutos en oscuridad. Se realizaron controles negativos de autofluorescencia de la propia muestra (sin la adición de anticuerpos), de anticuerpos secundarios utilizados y de controles negativos IgG para ver las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo primario utilizado, tanto para las muestras sin ningún estímulo como para las muestras tratadas.

Las células teñidas se examinaron utilizando microscopía confocal de barrido láser (microscopio confocal espectral Leica TCS SP2) con el *software Leica LCS Lite*, situado en la Unidad Central de Investigación Médica (UCIM) de la Universidad de Valencia. Se tomaron varias capturas de imagen de campo amplio y de cada combinación de filtros por preparación con diferentes objetivos.

En la tabla 3.8, se muestra la composición de los tampones utilizados.

Reactivos microscopía confocal	
Buffer 1	PBS, BSA 1%, TRITON X-100 0.3%
Buffer 2	PBS, BSA 0.25%, TRITON X-100 0.1%

Tabla 3.8 Composición de los principales reactivos utilizados para el estudio de las muestras mediante microscopía confocal.

6.2 Co-localización CXCR4-Lyn en los *lipids raft* de la membrana celular

Se sembraron 3×10^6 de células de la línea celular Mec-1 y de pacientes LLC-B en placas de cultivo de 24 pocillos en presencia y ausencia de tratamiento. Tras el tratamiento con 50 ng/ ml de VEGF-165 durante 24h en incubador de CO₂ a 37°C, se procedió a realizar el mismo protocolo descrito en el apartado anterior pero utilizando diferentes combinaciones de los siguientes anticuerpos.

			Dilución empleada	Casa comercial
Anticuerpos primarios	CD19 Rabbit		1:1000	ABCAM
	CXCR4 Rabbit		1:100	ABCAM
	Flotilin Rabbit		1:200	ABCAM
	Lyn Mouse		1:200	ABCAM
	Phospho Lyn Rabbit		1:200	ABCAM
	Emisión- excitación (nm)			
Anticuerpos secundarios	Alexa 546 Rabbit / Mouse	561-572	1:1000	INVITROGEN
	Alexa 647 Rabbit /mouse	652-668	1:1000	INVITROGEN
	PE	488;565-578	1:1000	INVITROGEN
	Hoescht		1:500	

Tabla 3.9. Anticuerpos utilizados en microscopía confocal

7. Análisis de expresión proteica mediante la técnica de *Western blot*

Para determinar las formas totales y fosforiladas de las diferentes MAPKs estudiadas, las células de LLC-B, tanto de pacientes como líneas celulares leucémicas empleadas, no tratadas o pre-tratadas durante 1 hora a 37°C con los inhibidores en estudio (tabla 3.7), se estimularon con 50 ng/ml de VEGF-165 durante 24h en incubador de CO₂ a 37°C. Tras centrifugación y lavado celular a 4°C, se procedió a la extracción de las proteínas.

7.1 Extracción de proteínas

7.1.1 Extracción proteína total

Para la realización de la extracción total de proteína, se centrifugaron las células a 1500 rpm durante 5 minutos. A continuación se disgregó el pellet celular resultante con jeringa mediante tampón de lisis con ortovanadato (Sigma) y un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma) de preparación extemporánea. La composición del tampón de lisis queda reflejada en la tabla 3.10. Seguidamente, las muestras fueron incubadas durante 15 minutos en hielo y tras un golpe intenso de vortex de 30 segundos, se centrifugaron a 13000 g durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, los sobrenadantes resultantes fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.

Reactivos	Concentración
Hepes	20mM
NaCl	100mM
Triton x-100	1%
NaF	50mM
β-glicerofosfato	10mM
PMSF	1mM
Ortovanadato sódico	30ul/ml
Cóctel Inhibidores de proteasas	2ul/ml

Tabla 3.10 Concentración de los reactivos utilizados para la realización del tampón de lisis utilizado en la extracción de proteína total. Se utilizó 1 ml de tampón de lisis por 2×10^7 células.

7.1.2 Extracción de proteínas de membrana

Para la extracción de las proteínas presentes en los *lipids raft* nos basamos en el procedimiento de George KS y cols (237), realizando el siguiente protocolo en hielo:

- 1) Lavado de las células con PBS frío (1.5ml/10cm frasco).
- 2) Adición de 1ml de DTSSP (3,3- dithiobis sulfosuccinimidyl propionate; Thermo Scientific) 1,25Mm.
- 3) Reposado 1h en hielo.
- 4) Lavado de las células con PBS frío y añadir 5mM EDTA.
- 5) Adición de 0,75ml PBS frío más 5mM EDTA.
- 6) Recogida de la solución en tubos estériles de centrífuga de 1,5 ml de volumen.
- 7) Centrifugado 10 minutos a 11200g a 4°C.
- 8) Eliminación del sobrenadante.
- 9) Congelado a -80°C durante 24h.
- 10) Reposado del pellet celular en hielo durante 10 minutos.
- 11) Adición de 0,25 ml por tubo de TBS frío.
- 12) Disgregado del pellet mediante pipeta automática.
- 13) Centrifugado durante 10 minutos a 11200g a 4°C.
- 14) Eliminar el sobrenadante.
- 15) Adición de 8ul del coctel de inhibidor de proteasas (Sigma) a 4ml del tampón de separación (*membrana raft isolation buffer*) con 0,1% de Triton X-100.
- 16) Adición de 0,8 ml de 0,1% Triton X-100 al pellet celular.
- 17) Disgregado del pellet con pipeta automática.
- 18) Vorteadado durante 10 segundos quedando la solución homogénea, sin acúmulos de células.
- 19) Disgregado con jeringa 20 veces.
- 20) Centrifugado a 112g durante 10 minutos a 4°C.
- 21) Transferido de 500 µl de sobrenadante postnuclear a un vial nuevo.
- 22) Adición de 1 ml de medio de densidad de gradiente Optiprep (60% Iodixanol; Sigma) y vortear, resultando una solución de 40% Iodixanol de células lisadas.

- 23) Transferido de 40% solución a un nuevo tubo.
- 24) Adición de las soluciones de 30% y 5% de Iodixanol cuidadosamente con pipeta pasteur, quedando un gradiente visible.
- 25) Centrifugado durante 5 horas a 132000g a 4°C (ultracentrífuga Optima XL100)
- 26) Recogido de las cinco fracciones visibles resultantes de igual volumen 0,8ml
- 27) Separado de la segunda fracción del gradiente, donde se encuentran los lipids rafts de la membrana celular, entre el 5% y el 30% Iodixanol.
- 28) Congelación a -80°C de las diferentes fracciones resultantes.

La composición de los reactivos utilizados se muestra en tabla 3.11:

Composición reactivos	
Tampón separación Raft	Tris-Hcl 50mM ph=7,4+NaCl 150mM+EDTA 5mM+Triton 0,1% X-100
Solución 30% Iodixanol	5ml de Optiprep +5ml 0.1% Triton X-100
Solución 5% Iodixanol	1ml Optiprep+ 11 ml 0,1% Triton X-100

Tabla 3.11 Composición de los reactivos utilizados en la extracción de proteínas de membrana.

Tras este proceso, las proteínas fueron sonicadas y cuantificadas por el método de Bradford y/o Lowry mediante espectrofotometría utilizando una curva patrón de BSA (albúmina sérica bovina, Sigma-Aldrich) con seis puntos de concentraciones conocidas con valores de 0,2µg/µl a 1,4 µg/µl.

7.2 Cuantificación proteínas

7.2.1 Método Bradford

Se añadieron 5µl de muestra proteica de concentración desconocida más 245µl de reactivo Bradford (Sigma), previamente atemperado durante una hora, a cada pocillo de una placa de 96 (Costar). Se mantuvo en oscuridad hasta que se observó el viraje de color rojo a azul resultado de la unión del colorante Azul Brillante de Coomasie a la proteína, leyéndose la absorbancia a 595nm. Se realizaron medidas por duplicado tanto para la curva patrón como para las muestras de interés. Posteriormente, se realizaron los cálculos pertinentes con la curva estándar de concentración conocida interpolando la absorbancia de la muestra, y determinando así su concentración.

7.2.2 Método Lowry

La valoración cuantitativa de las proteínas por este método colorimétrico se realizó añadiendo 10 µl de muestra, 500 µl del reactivo Lowry (Sigma) y 490 µl H₂O destilada, quedando un volumen final de 1 ml en la cubeta. Tras 20 minutos en oscuridad a RT, se añadieron 250 µl del reactivo Folin (Sigma) y se dejó reposar durante 30 minutos. El complejo formado al unirse a las proteínas se observó con diferentes intensidades de color, proporcionales a la concentración de proteínas según la ley de Lambert-Beer. Por último, se realizó la lectura de la absorbancia a 660 nm, ajustando el espectrofotómetro a 0 con el blanco.

7.3 Protocolo de *Western blot*

Posteriormente, se resuspendieron las muestras en *buffer Laemmli* 4x (Sigma) y se calentaron 5 min a 90°C en el TermoBlocquer (Eppendorf) antes de la resolución por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico (*SDSPAGE, Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*).

Una vez cuantificadas las proteínas, se cargaron además del marcador de pesos moleculares (Bio-Rad), 30 µg de muestra en el gel SDS-PAGE al 12% de Acrilamida

(29:1 Acrilamida:Bisacrilamida) con un 0,1% de SDS, y se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante de 100 voltios durante el tiempo necesario para la correcta separación de las proteínas (90 minutos aproximadamente) embebido en el tampón adecuado (*Running buffer*: 25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1%, SDS, pH 8,3).

Una vez realizada la separación electroforética de las proteínas, estas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Miniprotein II (BioRad, USA). El proceso duró 90 minutos, a una temperatura de 4°C para evitar sobrecalentamiento y a una intensidad constante de 240 mA en tampón de transferencia (*Transfer buffer*: 25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

Tras la transferencia, la membrana fue bloqueada durante 10 minutos a RT incubándola en 1 x TBS (Tris-buffered saline: 20 mM Tris-buffered saline, 137 mM NaCl, pH 7,6), que contenía 5% leche desnatada en polvo o 5% BSA, dependiendo del anticuerpo utilizado, para evitar con ello la formación de uniones inespecíficas. A continuación se realizaron 3 lavados de 5 minutos en plataforma oscilante con 10 ml de TBS disuelto en 1% leche en polvo o 1% BSA.

Una vez eliminados los restos de tampón de bloqueo, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios 1/1000 diluidos con la solución de bloqueo al 5% BSA o 5% leche durante toda la noche a 4°C con agitación.

Al día siguiente, tras otros 3 lavados en agitación, las membranas se incubaron durante 1h con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano anti-IgG de conejo (*anti-mouse IgG HRP; Cell Signaling*) o de ratón (*anti-rabbit IgG HRP; Cell Signaling*), dependiendo de la procedencia del anticuerpo primario utilizado, disueltos al 5% BSA o leche. La dilución utilizada fue de 1/2000, excepto en los controles internos β -actina (*Sigman-Aldrich, St Louis, MO, USA*) y α -tubulina (*Santa Cruz Biotechnology*) para los que se realizó una dilución 1/7500 para ratón y 1/2500 para conejo. Los anticuerpos utilizados, se muestran en la tabla 3.12.

Anticuerpos primarios	Pm (kda)	Dilución empleada	Casa comercial
β-actina	42	1:1000	Sigma-Aldrich
α-tubulina	55	1:500	Santa Cruz Biotechnology
CXCR4	45-62	1:1000	Abcam
Phospho CXCR4		1:1000	Abcam
P44/42 MAPK	42-44	1:1000	Cell Signaling
Phospho P44/42 MAPK		1:1000	Cell Signaling
P38 MAPK	43	1:1000	Cell Signaling
Phospho P38 MAPK		1:1000	Cell Signaling
AKT	60	1:1000	Cell Signaling
Phospho AKT Ser473/Thr308		1:1000	Cell Signaling
SAPK/JNK	46-54	1:1000	Cell Signaling
Phospho SAPK/JNK Thr183/Tyr185		1:1000	Cell Signaling
Lyn	56	1:1000	Abcam
Phospho Lyn		1:1000	Abcam
Flotilin	47	1:1000	Abcam

Anticuerpos secundarios	Dilución empleada	Casa comercial
Anti-mouse IgG HRP	1:7500	Cell Signaling
Anti-rabbit IgG HRP	1:2500	Cell Signaling

Tabla 3.12 Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el Western Blot.

Tras efectuar diversos lavados de la membrana con TBS-Tween (20 mM Tris-buffered saline TBS, 137 mM NaCl, pH 7, 6, suplementado con 0,1% Tween-20) para minimizar la aparición de uniones inespecíficas, las proteínas se visualizaron tras la incubación de las membranas con una solución reveladora SuperSignal™ (*SuperSignal*

West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce) durante un minuto o mediante el kit ECL de quimioluminiscencia (*Amersham Pharmacia Biotech*).

La detección de las proteínas se realizó con el analizador de imagen *Image-Quant TM LAS4000* (*GE healthcare*), digitalizando la imagen de la membrana. Las valoraciones densitométricas de cada proteína se determinaron con el *software Image Gauge 4.0*, realizando una valoración semicuantitativa de la cantidad de proteína presente en cada muestra. Para poder reutilizar la membrana y rehibridarla con otro anticuerpo primario, se trataron las membranas con un tampón de *stripping* comercial (*Phospho antibody Stripping Solution de Cell Biolabs INC*) o de preparación manual con 200 mM de glicina, 500 mM de NaCl ajustando el PH a 2,8.

	Gel separador	Gel Concentrador
	Volumen (ml)	Volumen (ml)
H₂O	6,6	2,7
30% Acrilamida	8	0,67
1,5 M TRIS (PH 8,8)	5	0,5 (PH 6,8)
10% SDS	0,2	0,04
10% APS	0,2	0,04
TEMED	0,008	0,004

Tabla 3.13 Reactivos utilizados para la preparación de los geles SDS-PAGE al 12%.

8. Polimorfismos en los genes *VEGF*, *VEGF-R1* y *bFGF*

Para el estudio de los polimorfismos (SNPs) de los genes angiogénicos seleccionados, *VEGF*, *VEGF-R1* y *bFGF*, se procedió al genotipado de seis SNPs a partir de sangre periférica o muestra celular almacenada y criopreservada en N₂, de 240 pacientes con LLC-B y de 476 individuos sanos donantes de sangre del Hospital Clínico Universitario de Valencia, tomados como controles.

Los SNPs estudiados fueron: -710 C/T, localizado en el promotor de *VEGF-R1*, cuatro SNPs del gen *VEGF*: 936 C/T rs3025039, rs 833052, rs 1109324, rs 1547651; y por último 223 C/T rs 1449683 en el gen *bFGF*. Sus características se muestran en la tabla 3.14.

Gen	Cr	Posición cr	Ref SNPs	Substitución	Alelo minoritario	Localización	Taqman Assay
VEGF	6	43860514	rs3025039	C/T	T	3'UTR	C_16198794_10
VEGF	6	43837733	rs1109324	A/C	A	Promotor	C_8311589_10
VEGF	6	43838622	rs1547651	A/T	T	Promotor	C_8311590_10
VEGF	6	43831313	rs833052	A/C	A	Promotor	C_8311590_10
VEGF-R1	13	-	rs111458691	C/T	T	Promotor	C_27837581_10
bFGF	4	rs123967536	rs1449683	C/T	T	Cds-syn	C_8837641_10

Tabla 3.14. Características de los SNPs estudiados

8.1 Extracción de ácidos nucleicos

Para todas las muestras de pacientes empleadas, la obtención de ADN genómico se realizó a partir de SP mediante *QIAcube* (*QIAGEN*®) siguiendo el protocolo comercial. Sin embargo, el ADN de la población control, fue extraído mediante *Ultra Clean Tissue DNA Isolation Kit* (*MOBIO*®). En ambos casos, la elución obtenida fue de 100 µl calculando la concentración obtenida mediante espectrofotometría, en concreto se cuantificó el ADN usando el NanoDrop2000 (*Thermo Scientific*) midiendo la absorbancia a 260nm. La pureza de las muestras se determinó evaluando el cálculo del ratio de absorbancia 260/280, siendo el valor óptimo para el ADN de 1,8. Todas las muestras de ADN fueron guardadas a -20°C hasta su análisis.

8.2 Método de detección de SNPs

El análisis del genotipo se llevó a cabo por PCR en tiempo real, mediante sondas *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays* (*Applied Biosystems*) permitiendo discriminar entre dos alelos de un SNP específico.

Cada reacción estuvo compuesta por 2,5µl *TaqMan Genotyping Master Mix*, 0,12µl de *Taqman Probe Assay* 40x y 15ng de ADN. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en placas de 384 muestras, incluyendo dos controles negativos sin ADN.

La detección de los SNPs se realizó en el termociclador *ABI Prism 7900* usando el *Sequence Detection Software* (*Applied Biosystems*). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un primer paso de 50°C durante 2 min, segundo paso de 95°C por 10 min y un tercer paso consistiendo en 45 ciclos de 95°C de 15 segundos y 60°C de 1 minuto.

Por último, las muestras fueron analizadas en el *7900 HT Fast Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*) usando el programa de discriminación alélica con el *Software version 2* (*Applied Biosystems*).

9. Análisis estadístico

9.1 Variables estudiadas

De todos los pacientes que se incluyeron en este estudio, se recogieron los siguientes parámetros:

Variables clínico-biológicas: nombre, edad, sexo y fecha al diagnóstico; Hemoglobina, recuento absoluto de leucocitos, recuento absoluto de linfocitos, tiempo de duplicación linfocitaria, recuento de plaquetas, morfología de linfocitos; estadiaje de Rai y Binet, presencia de adenopatías, patrón de infiltración de la biopsia medular, presencia de masas ganglionares superiores a 5 cm; niveles séricos de LDH y de β 2- microglobulina.

Variables inmunofenotípicas y moleculares: expresión de CD38 (valor de corte considerado para determinar su positividad es que se exprese en 20% o más de la población linfoide leucémica), ZAP-70 (considerándose expresión positiva \geq 20%), alteraciones citogenéticas, expresión de los receptores de VEGF (FLT1, KDR y FLT4), MMP-9, VEGF intracitoplasmático, bFGF, migración celular, viabilidad y expresión de CXCR4, CCR7 y CD49d basal y tras diferentes tratamientos.

Variables asociadas al tratamiento: tipo de tratamiento de primera de línea, fecha de inicio, grado de respuesta, fecha de la respuesta, duración de la misma, tratamiento de segunda línea, duración y respuesta, procedimientos quirúrgicos, complicaciones, segundas neoplasias, muerte, causa y fecha de la misma, así como los resultados moleculares obtenidos para cada paciente: expresión de CD38 (valor de corte considerado para determinar su positividad es que se exprese en 20% o más de la población linfoide leucémica) y Zap-70, alteraciones citogenéticas, estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de la Ig (IgVH).

Por último, incorporamos a nuestra base de datos el genotipo obtenido para los seis polimorfismos estudiados, uno localizado en el promotor del *VEGF-R1* [-710 (C/T)], cuatro SNPs rs1109324, rs1547651, rs3025039 [936 (C/T)], rs833052 del gen *VEGF* y el SNP rs1449683 [223 (C/T)] en el gen *bFGF*.

9.2 Métodos estadísticos utilizados en los análisis

9.2.1 Análisis descriptivo univariante

El estudio descriptivo de las variables cualitativas se realizó mediante el cálculo de la frecuencia absoluta y de la frecuencia relativa en porcentajes, siendo representado gráficamente en sistema de sectores o diagrama de barras. Para el estudio del ajuste a una distribución normal de las variables cuantitativas, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables continuas fueron representadas como media +/- desviación estándar (DE) ó mediana y rango intercuartílico.

9.2.2 Análisis bivariante

La correlación entre variables continuas se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson y/o de Spearman, y tabla de contingencia con el test de Chi-cuadrado para las variables cualitativas. Debido a la variabilidad existente en los datos obtenidos de pacientes y al limitado tamaño muestral en algunos análisis, se aplicaron test no paramétricos Kruskal-Wallis, validado con el estadístico de Chi-cuadrado para las variables categóricas. Para las variables cuantitativas que no seguían una distribución normal, utilizamos la U de Mann-Whitney y la T de Wilcoxon para el análisis de medias en muestras independientes y apareadas, respectivamente.

Para el análisis del genotipado de los SNPs, distribuciones de los genotipos, frecuencias de los haplotipos esperados del gen *VEGF* y pruebas de asociación y análisis de desequilibrio de ligamiento (LD), se emplearon las herramientas metodológicas estadísticas del programa oncológico catalán SNPStats (238). Para cada polimorfismo, el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se realizó mediante la comparación de las

frecuencias genotípicas observadas y esperadas en los pacientes LLC-B y controles, mediante un test Chi-cuadrado (χ^2). Los análisis de χ^2 se utilizaron para determinar las diferencias en la distribución de los genotipos de *VEGF* y *bFGF* entre casos y controles empleados en el estudio, con un nivel de significación del 5%. Los valores Odds Ratio (OR) y su intervalo de confianza del 95% (IC) para el riesgo relativo se calcularon como una medida de la asociación entre los diferentes genotipos y el riesgo de padecer LLC-B. El criterio de información Akaike y Bayesiano (AIC y BIC) fue calculado para seleccionar el mejor modelo para cada SNPs, tomando como mejor modelo aquel con los menores valores de AIC y BIC.

La asociación entre las principales variables clínicas y biológicas de los pacientes (previamente descritas) con los genotipos obtenidos del *VEGF*, *VEGF-R1* y *bFGF* se calculó mediante pruebas de Chi-cuadrado (χ^2) y rango de correlación de Spearman o Pearson (variables ordinales o continuas). También se realizaron pruebas de regresión lineal. El análisis de datos estadísticos fue realizado con los programas SPSS (IBM SPSS Statistics, versión 22.0) y SNPStats, considerando diferencias estadísticamente significativas un *p-valor* $\leq 0,05$.

9.2.3 Análisis de supervivencia

La supervivencia global (OS) fue definida como el tiempo transcurrido desde la fecha de diagnóstico hasta la muerte debido a la enfermedad o al final del seguimiento (observación censurada). El tiempo hasta el primer tratamiento (TTP; *time to progression*) fue llamado al intervalo de tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico hasta el primer tratamiento. Las probabilidades de supervivencia se calcularon de acuerdo con el método de Kaplan-Meier, mientras que las diferencias significativas entre las curvas de supervivencia se evaluaron con el test de *log rank Mantel's*. El análisis incluyó a los pacientes con seguimiento clínico, siendo la mediana de 80,48 meses \pm 56,42. Los resultados fueron representados gráficamente mediante curvas de supervivencia. El análisis multivariante para la supervivencia global y para el tiempo al primer tratamiento se realizó mediante la regresión de riesgos proporcionales de Cox.

IV. RESULTADOS

1. Descripción general de los sujetos incluidos en el estudio

Tal y como se ha adelantado en el apartado anterior, para el desarrollo del estudio se seleccionaron un total de 230 pacientes diagnosticados de LLC-B, con una edad mediana de 67 años (rango 33-93).

Las principales características clínicas y biológicas de la serie se describen en la tabla 4.1.

Variable	Resultado n (%)
Edad mediana , extremos	67 (33 a 93)
Sexo	
Masculino	81 (39.7)
Femenino	123 (60.3)
Morfología (n=179)	
Típica	118 (65.9)
Atípica	61(34)
Alteraciones citogenéticas (n=154)	
Bajo riesgo (del13q, CN, +12)	136 (88.3)
Alto riesgo (del11q, del17p)	18 (10)
Expresión CD38 (n=172)	
≥ 20%	74(43)
< 20%	98 (56.9)
Expresión ZAP-70 (n=129)	
≥ 20%	80(62)
< 20%	49 (37.9)
Estadio Rai (n=186)	
0	117 (62.9)
I	48 (25.8)
II	14(7.5)
III	2 (1)
IV	5 (2.7)
Estadio Binet(n=186)	
A	163 (87.6)
B	16 (8.6)
C	7 (3.76)

LDH elevada(n=184)	
Elevada(> LSN)	36 (19.6)
normal	148 (80.4)
β₂-microglobulina (n=177)	
Elevada (> LSN)	34 (19)
normal	143 (80.8)
Adenopatías (n=189)	65 (31.9)
Tratamiento ((n=159)	85 (41.7)

Tabla 4.1 Características clínico-biológicas de los pacientes LLC-B.

Los valores hematológicos y bioquímicos en sangre periférica de 171 pacientes LLC-B en el momento del diagnóstico, se muestran en la siguiente tabla:

	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
Hemoglobina	13,7	5,2	132	9,25
Leucocitos	15,7	4,3	424,5	4,13
Linfocitos	9,5	1,3	380,4	3,58
Plaquetas	191	21	382	5,08
LDH	350	114	1294	12,45
β₂-microglobulina	1,9	0,5	8,2	0,09

Tabla 4.2 Valores hematológicos y bioquímicos al diagnóstico en sangre periférica de 171 pacientes LLC-B: Hemoglobina (g/dl), recuento de leucocitos ($\times 10^9/L$), recuento de linfocitos ($\times 10^9/L$), recuento de plaquetas ($\times 10^9/L$), niveles séricos de LDH (UI/L) y de β₂- microglobulina (g/L).

1.1 Análisis de la supervivencia

El estudio univariante para el tiempo al primer tratamiento (TTP) puso de manifiesto que los pacientes con expresión de ZAP-70, CD38, riesgo citogenético elevado y niveles elevados de LDH y β₂-microglobulina, presentaron un intervalo al

primer tratamiento significativamente más corto que el resto. En la tabla siguiente se muestran en detalle los resultados de dicho análisis.

Variable	HR	IC 95%	p
CD38 positivo versus negativo	2,472	1,308 a 3,861	< 0.001
ZAP-70 positivo versus negativo	2,239	1,344 a 3,834	0.003
Presencia de del17p/del11q versus resto	2,654	1,477 a 4,770	0.04
B₂-microglobulina elevada	2,657	1,558 a 4,531	< 0.001
LDH elevada	1,611	0,966 a 2,689	0.068

Tabla 4.3 Análisis univariante para el tiempo al primer tratamiento: principales variables identificadas.

En cuanto al análisis de la supervivencia global, los pacientes con positividad para CD38, ZAP-70, estadio avanzados de Rai y Binet, alteraciones citogenéticas de alto riesgo y niveles elevados de β_2 -microglobulina presentaron una supervivencia significativamente inferior al resto. En la tabla 4.4 se muestran dichos resultados.

Variable	HR	IC 95%	p
CD38 positivo versus negativo	1,941	1,163 a 3,241	0,011
ZAP-70 positivo versus negativo	2,656	1,344 a 5,429	0,005
Estadio Rai II-IV versus 0,I	2,563	1,392 a 4,720	0,003
Estadio Binet B,C versus A	2,534	1,402 a 4,580	0,002
Presencia de del17p/del11q versus resto	2,159	1,005 a 4,639	0,04
B₂-microglobulina elevada	3,66	2,066 a 6,489	<,001
LDH elevada	1,772	1,030 a 3,049	0,039

Tabla 4.4 Análisis univariante para la supervivencia global: principales variables identificadas.

Finalmente, en el estudio multivariante mediante una regresión de riesgos proporcionales de Cox (introducción de variables hacia atrás), las únicas variables que mantuvieron un valor pronóstico independiente para la SG y el TTP fueron los niveles elevados de β_2 -microglobulina y la expresión de CD38 (Tabla 4.5).

A)

Variable	HR	IC 95%	p
CD38 positivo versus negativo	2,500	1,518 a 4,116	< 0.001
β₂-microglobulina elevada	2,548	1,404 a 4,621	0.002

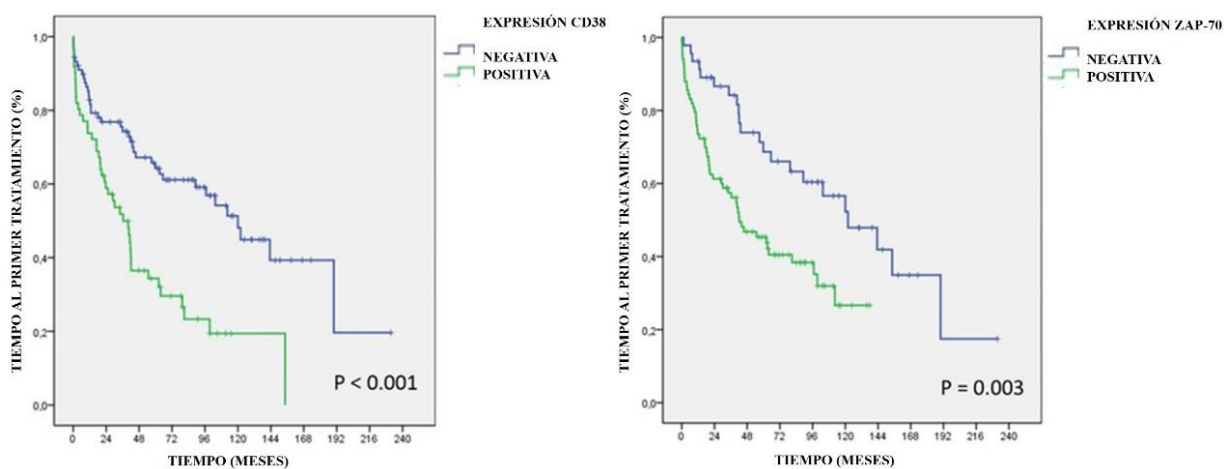
B)

Variable	HR	IC 95%	p
CD38 positivo versus negativo	2,152	1,190 a 3,891	0.011
β₂-microglobulina elevada	2,721	1,354 a 5,469	0.005

Tabla 4.5 Análisis multivariante: principales variables identificadas. A) Tiempo al primer tratamiento B) Supervivencia global.

A continuación se representan las curvas de SG y TTP en función de algunas de las variables mencionadas.

A)



B)

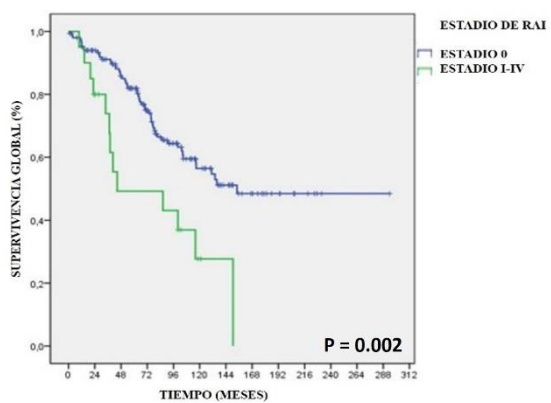
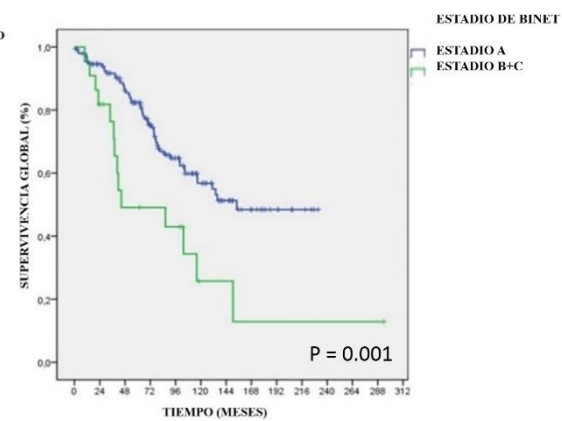
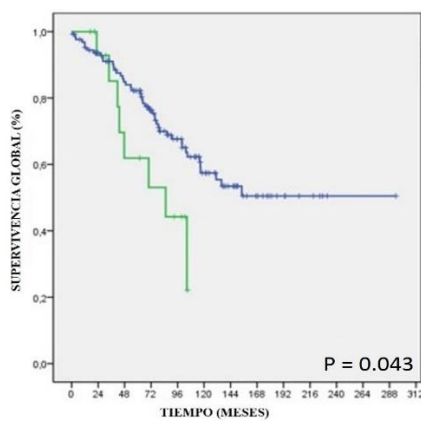
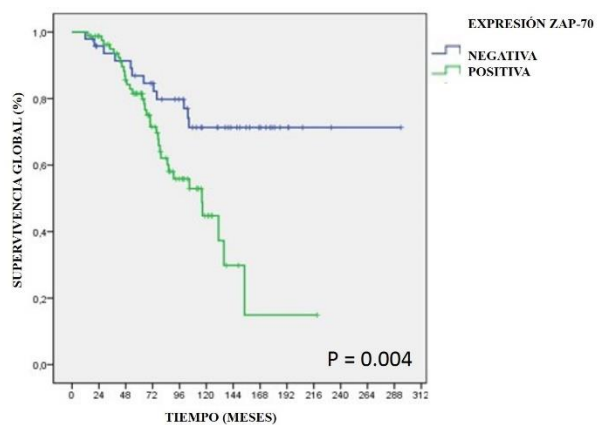
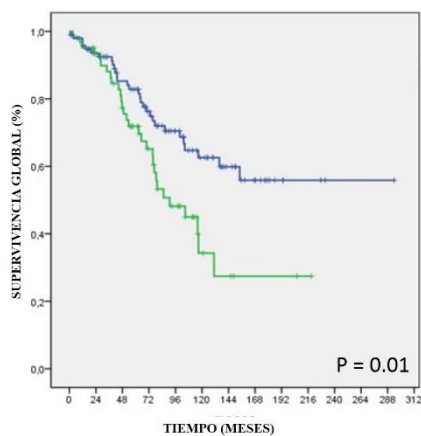


Figura 4.1 Curvas de supervivencia de los pacientes LLC-B. A) Curvas de TTP en función de la expresión de CD38 y Zap-70, B) curvas de SG en función de la expresión de CD38, Zap-70, riesgo citogenético y estado de Rai/Binet.

2. Estudio de expresión de los receptores angiogénicos de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3), de MMP-9 y de bFGF

2.1 Expresión diferencial de los receptores de superficie membrana VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y la expresión intracitoplasmática de MMP-9 y VEGF por CMF en pacientes con LLC-B y donantes sanos

En este estudio de expresión realizado por CMF mediante el uso de anticuerpos conjugados, incluimos 54 pacientes LLC-B y 40 sujetos sanos empleados como grupo control. Analizamos la positividad (porcentaje celular que expresó cada molécula), así como la intensidad de expresión obtenida, representada como la media de intensidad de fluorescencia (IMF) (Figura 4.2).

Se llevaron a cabo pruebas no paramétricas para muestras independientes, puesto que los datos no se ajustaban a una distribución normal (Kruskal Wallis test). Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de la expresión de los receptores de VEGF en el grupo de pacientes y los sujetos sanos aplicando el test de Wilcoxon.

Los resultados mostraron una mayor expresión (IMF) de los tres receptores del VEGF en los pacientes que en el grupo control (p-valor=0,08, p-valor=0,006 y p-valor<0,001 para VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, respectivamente). También se observó una mayor expresión de VEGF intracitoplasmático en los pacientes tanto en el porcentaje de células que lo expresaban (p-valor=0,006), como en la intensidad de expresión (IMF) (p-valor<0,001), respecto a los controles. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de MMP-9 Los resultados detallados se muestran en la tabla 4.6 y gráficamente en la figura 4.2.

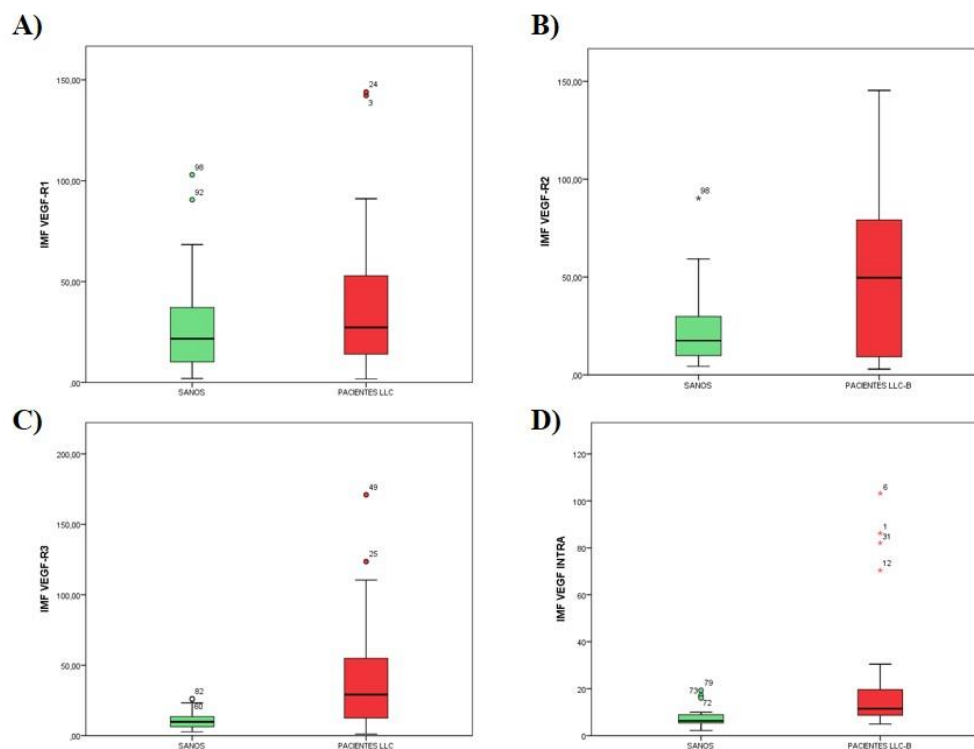


Figura 4.2 Diagramas de cajas de la expresión de los receptores de VEGF en el grupo de pacientes (representado en rojo) frente al grupo control (verde). Wilcoxon test. **A)** Expresión de VEGF-R1 (p-valor=0,089), **B)** VEGF-R2 (p-valor=0,006), **C)** VEGF-R3 (p-valor=0<0.001) y **D)** VEGF intracitoplasmático (p-valor=0<0,001).

Receptores	Controles sanos		Pacientes LLC-B	
	N	Media (rango±D.E)	N	Media (rango±D.E)
IMF VEGF-R1	39	27,03 (1,96-102,91±22,87)	52	31,32 (1,69-143,95±31,32)
IMF VEGF-R2	39	22,51 (4,36-90,23±17,103)	51	51,88 (2,96-145,34±41,77)
IMF VEGF-R3	39	10,63 (2,73-26,21±5,98)	49	39,02 (1,16-171,00±34,95)
IMF MMP-9 Intracitoplasmático	28	25,35 (2,37-100,34±23,67)	40	34,52 (8,48-249,95±47,97)
IMF VEGF Intracitoplasmático	27	7,68 (2,22-19,27±4,03)	39	20,78 (4,94-103,23±23,41)

Tabla 4.6 Estadísticos descriptivos de la expresión de VEGF-R1, VEGF-R2 y VEGF-R3, MMP-9 y VEGF intracitoplasmático en los pacientes LLC-B y en los individuos sanos tomados como controles. Los datos no significativos no se muestran en la tabla.

2.2 Cuantificación de la expresión génica de VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3 y bFGF por RTqPCR

Para el estudio de expresión de los genes angiogénicos VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3 y bFGF, se incluyeron 32 pacientes LLC-B y donantes sanos utilizados como grupo control. Los análisis por PCR cuantitativa de los linfocitos B de todas las muestras empleadas mostraron la existencia de diferencias de expresión entre los pacientes respecto al grupo control. Los niveles de expresión de VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y bFGF fueron superiores en los pacientes con LLC-B que en los linfocitos B del grupo control, siendo de especial relevancia el caso del factor de crecimiento de fibroblastos y del receptor angiogénico VEGFR-1 previo (Figura 4.3). A diferencia del resto de enfermos, los pacientes con mayores valores de expresión de estos genes requirieron tratamiento. En concreto, los pacientes con un valor de expresión superior a la mediana (30,21 para VEGFR-1 y 62,31 para bFGF) presentaron un intervalo de tiempo al primer tratamiento (TTP) significativamente inferior a los pacientes que no presentaban estas características (Figura 4.3).

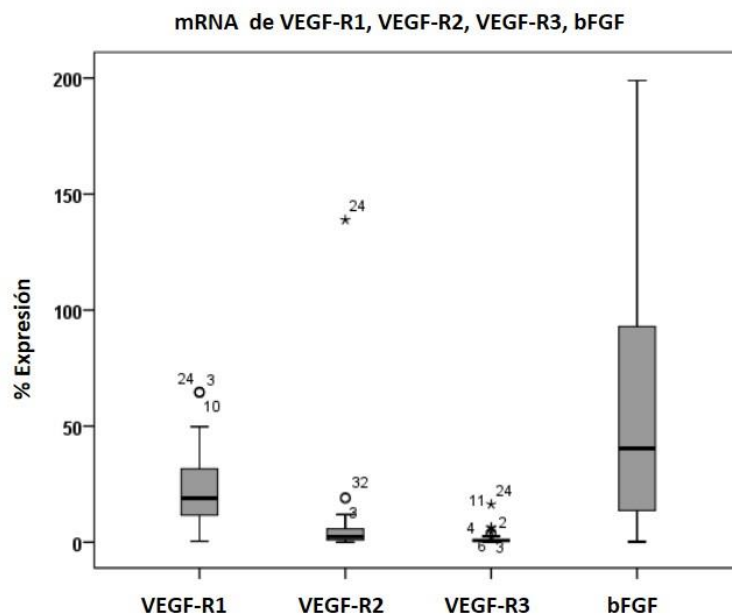


Figura 4.3 Porcentaje de expresión de VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y bFGF en linfocitos B de enfermos de LLC respecto a linfocitos B control (ciclos de expresión tras la normalización con el gen control endógeno GADPH). La expresión fue determinada por RTqPCR y los valores fueron calculados con respecto a los linfocitos B del grupo control.

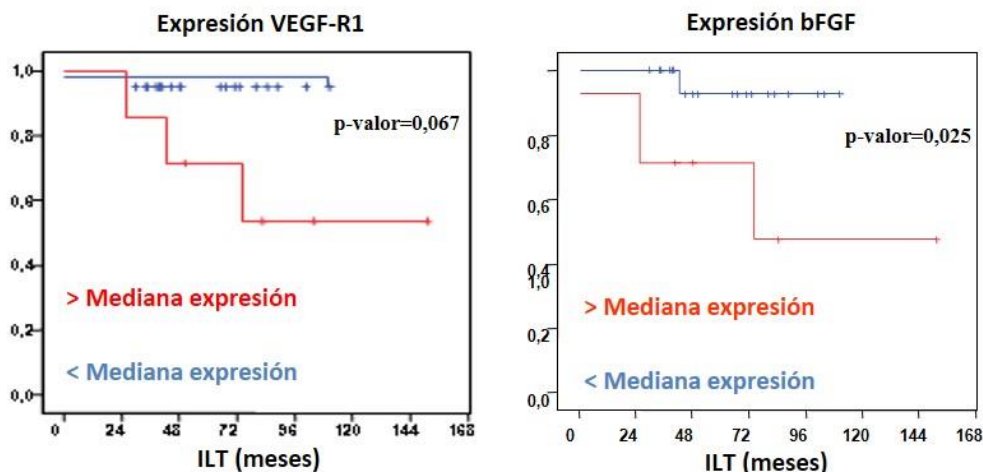


Figura 4.4 Intervalo libre de tratamiento (ILT) en pacientes LLC-B con valores de expresión de VEGF-R1 y bFGF superiores e inferiores a la mediana de expresión (30,21 y 62,31 respectivamente). Valores calculados respecto a los linfocitos B del grupo control.

mRNA	N	Media (rango±D.E)
VEGF-R1	32	22,66 (0,09-64,83±18,13)
VEGF-R2	32	8,34 (0,02-24,31±24,31)
VEGF-R3	31	1,80 (0,03-16,00±3,15)
bFGF	31	66,29 (0,14-429,18±86,20)

Tabla 4.7 Estadísticos descriptivos de la expresión génica (mRNA) de los tres receptores de VEGF y bFGF en los pacientes LLC-B.

2.3 Estudio de VEGF sérico mediante técnicas de ELISA

La determinación de los niveles de VEGF en el suero de 40 pacientes LLC-B mediante ensayos de ELISA, mostró concentraciones (pg/ml) muy heterogéneas (Figura 4.5). Todas las muestras séricas presentaron cantidades detectables de VEGF, con una media de 222 pg/ml, sin que se apreciaran diferencias respecto al sexo o la edad al diagnóstico.

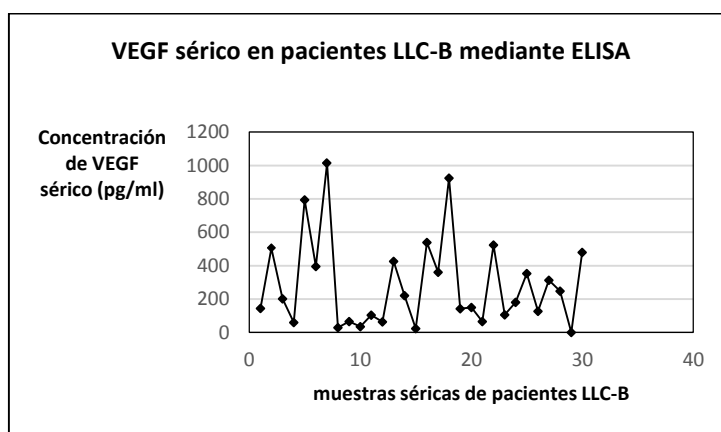


Figura 4.5 Cuantificación de los niveles séricos de VEGF en pacientes LLC-B.

2.4 Correlación de resultados con las principales características clínicas y biológicas de los pacientes LLC-B

Los resultados de expresión obtenidos mediante CMF mostraron una correlación positiva de la expresión de VEGF-R1 y VEGF-R2 (IMF, así como el porcentaje de células que lo expresaron) con el estadio de enfermedad de los pacientes, tanto para la clasificación Rai como para la de Binet. También se observó una correlación de la expresión de VEGF-R1 con la presencia de adenopatías. El test aplicado fue una correlación de Pearson y los p-valores, se muestran en la siguiente tabla:

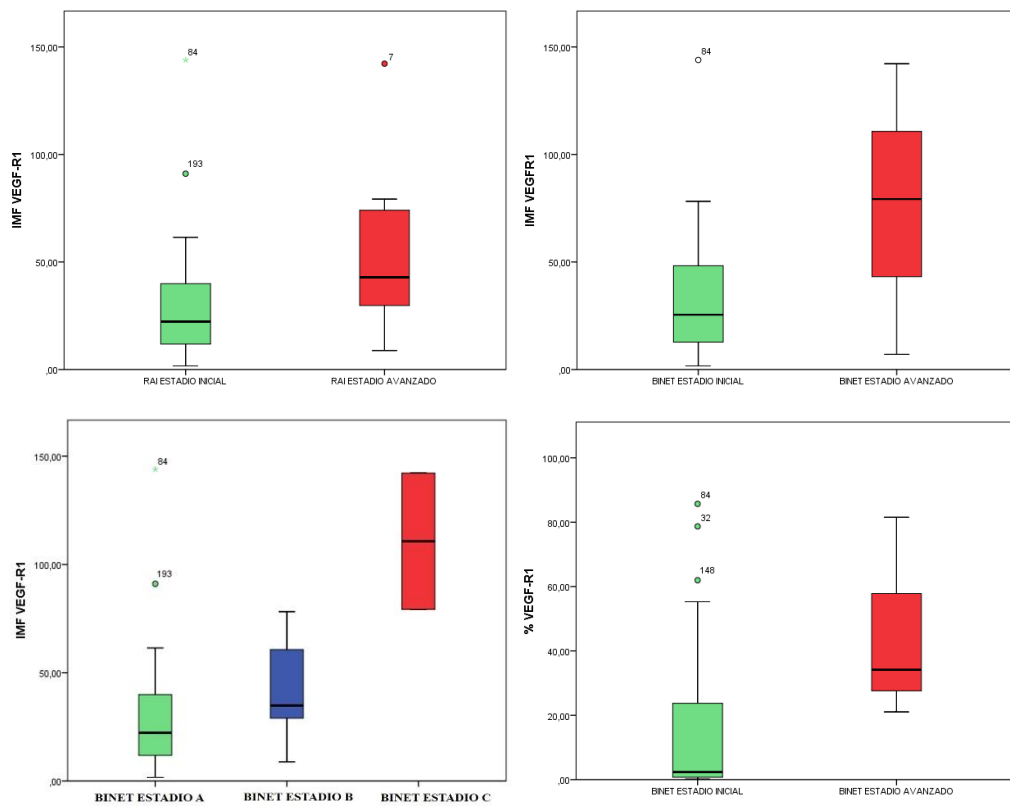
Expresión VEGF-R	Características clínicas	p-valor
IMF VEGF-R1	Estadio Rai	0,005
	Adenopatías	0,029
% VEGF-R1	Estadio Binet	0,027
IMF VEGF-R2	Estadio Rai	0,021
% VEGF-R2	Estadio Binet	0,033
	Estadio Rai	0,006

Tabla 4.8 Relación significativa de la expresión de los receptores de VEGF y las características clínicas y moleculares de los pacientes LLC-B.

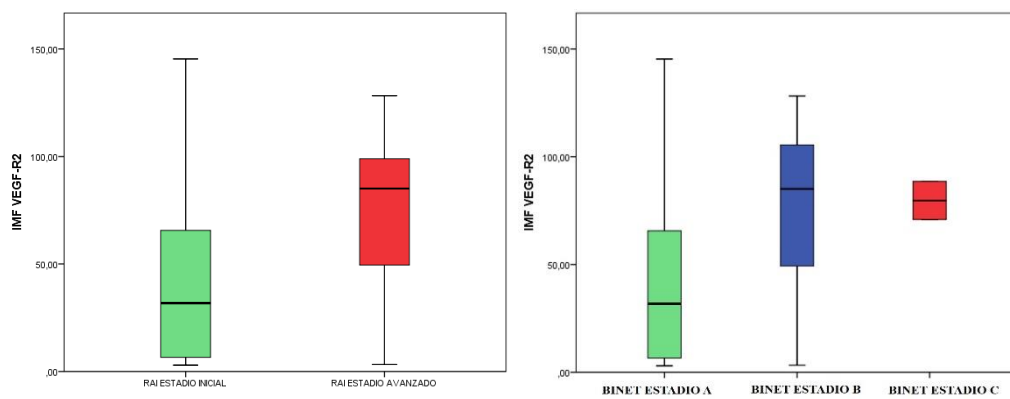
Se observó que los pacientes con estadios avanzados presentaban una mayor expresión estadísticamente significativa de VEGF-R1 y VEGF-R2 (IMF y % expresión celular) que los pacientes con estadios iniciales (U de Mann-Whitney). El test estadístico aplicado mostró un p-valor=0,022 respecto la asociación de la IMF de VEGF-R1 y la clasificación de RAI, y 0,027 para la clasificación de Binet. La asociación significativa de la IMF de VEGF-R2 mostró un p-valor=0,018 para la clasificación Rai y 0,016 para Binet. El porcentaje de expresión celular de VEGF-R1 y VEGF-R2 mostró una asociación significativa, con un p-valor=0,036 y 0,006 respectivamente, para el estadio de enfermedad Binet. Los valores obtenidos y el valor de la prueba de significación se detallan en figura 4.6.

IV. Resultados

A)



B)



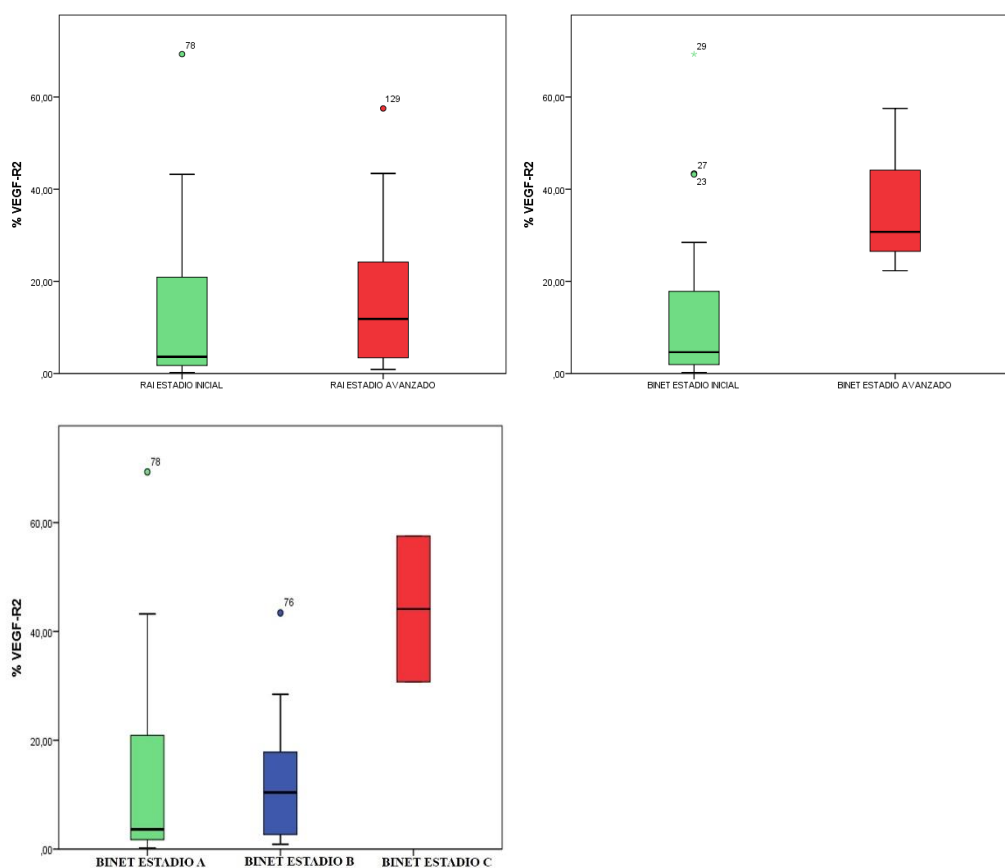


Figura 4.6 Expresión diferencial de VEGF-R1 (A) y VEGF-R2 (B) en pacientes LLC-B con diferentes estadios de enfermedad. La expresión, en IMF y % celular que expresan VEGF-R1 y VEGF-R2 de los pacientes con estadios iniciales se muestran en color verde, y en rojo los pacientes con estadios avanzados. Tanto la IMF como el porcentaje celular de expresión se vieron relacionados con la progresión tumoral. Los pacientes con estadios avanzados presentaron niveles superiores de expresión de VEGF-R1 y VEGF-R2 que los pacientes con estadios iniciales.

Los resultados también mostraron diferencias estadísticamente significativas en relación a la presencia de adenopatías, mostrando una mayor expresión de VEGF-R1 en los pacientes que presentaban adenopatías al diagnóstico frente a los pacientes LLC-B sin adenopatías (p-valor=0,048; U de Mann-Whitney) (Figura 4.7).

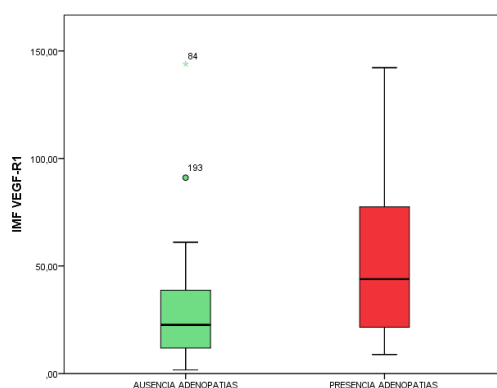


Figura 4.7 Expresión de VEGF-R1 en pacientes en base a la presencia/ausencia de adenopatías al diagnóstico. Los pacientes LLC-B con presencia de adenopatías al diagnóstico mostraron un aumento de expresión de VEGF-R1 respecto a los pacientes sin esta manifestación clínica (p-valor=0,048; U de Mann-Whitney).

Por otro lado, también se observó una correlación positiva de los niveles de expresión de los tres receptores del VEGF, tanto en términos de IMF como en relación al porcentaje celular de expresión, con la expresión de Zap-70 y CD38 que presentaban los pacientes LLC-B. En las siguientes figuras de diagramas de cajas se muestran los resultados significativos obtenidos.

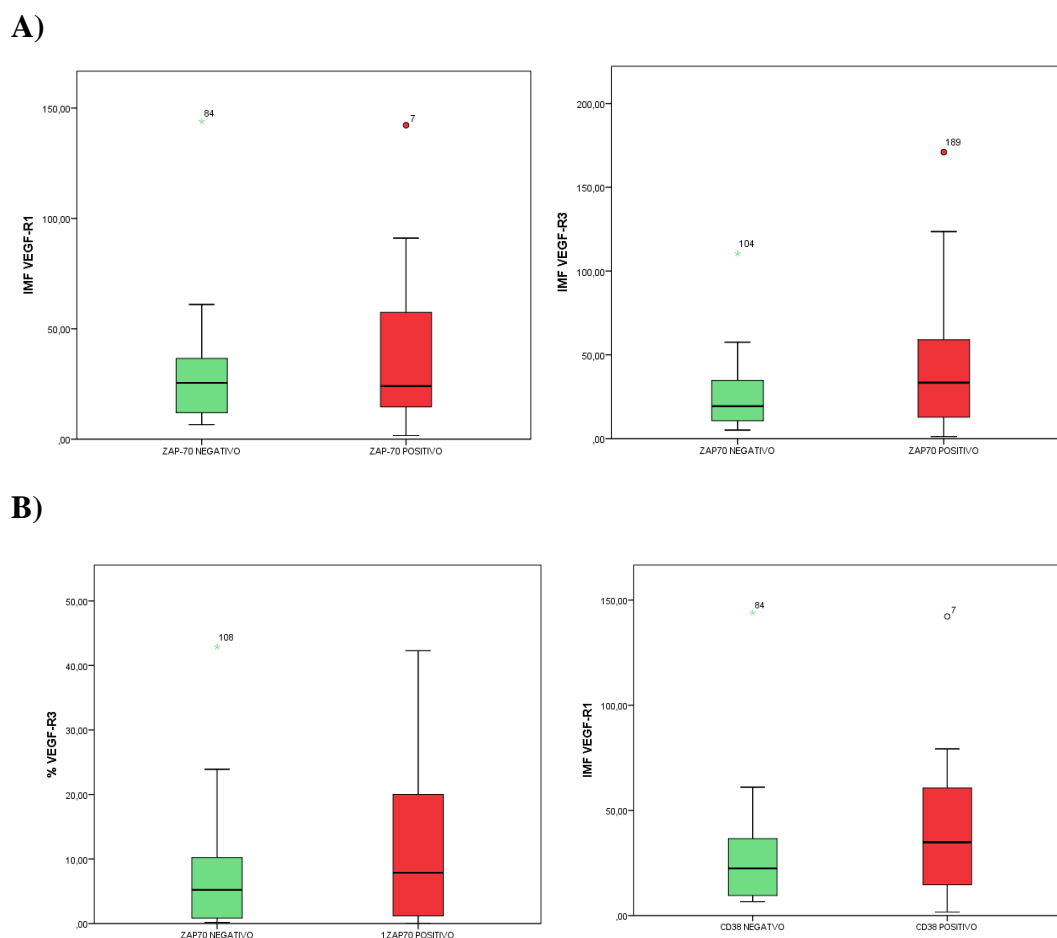


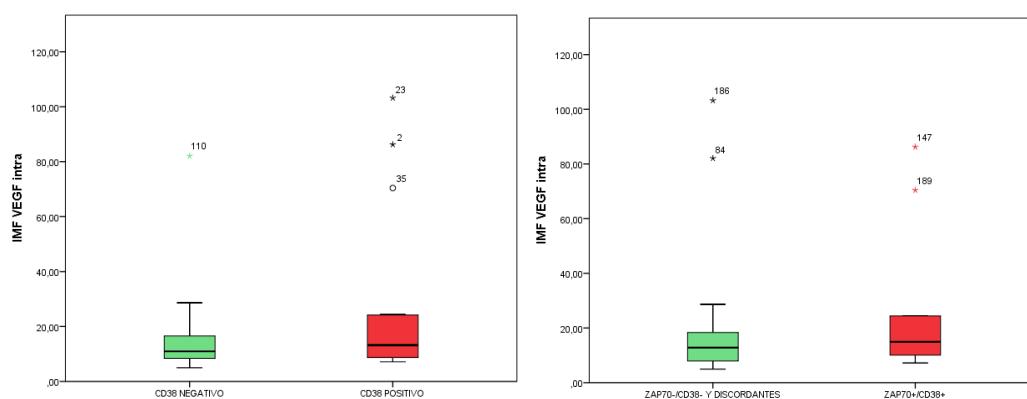
Figura 4.8 Expresión de VEGF-R1, VEGF-R2 y VEGF-R3 en pacientes LLC-B. En color verde se representa la expresión negativa de Zap-70 y CD38, y en rojo la expresión positiva. **A)** Zap-70 positivo ($\geq 20\%$ células que expresan la proteína) y Zap-70 negativo ($< 20\%$), p-valor=0,013, 0,009 y 0,009 para IMF VEGF-R1, IMF VEGF-R3 y % VEGF-R3 respectivamente (aplicando pruebas de regresión), **B)** CD38 positivo ($\geq 20\%$ células que lo expresan) y CD38 negativo ($< 20\%$), p-valor= (0,014).

Los análisis comparativos de la expresión intracitoplasmática de MMP-9 y VEGF por CMF en función de las principales características de los pacientes LLC-B, mostraron una relación estadísticamente significativa (regresión lineal) entre la masa *bulky* y la

expresión de MMP-9 (IMF p-valor<0,001 y % expresión celular p-valor<0,001), así como con la IMF de VEGF (p-valor=0,017).

Los resultados también mostraron una asociación significativa de la expresión de MMP-9 y VEGF intracitoplasmático (IMF) con la expresión CD38 (p-valor=0,001 y p-valor<0,001 respectivamente) y expresión de ZAP-70/CD38 (p-valor=0,013 y p-valor=0,004, respectivamente). También se observó una tendencia estadística del riesgo citogenético que presentaban los pacientes con la expresión de MMP-9 (p-valor=0,07 n.s) (Figura 4.9).

A)



B)

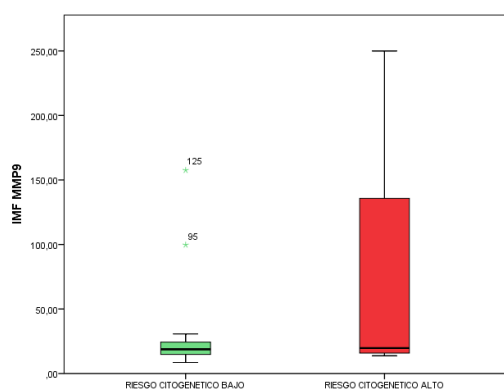


Figura 4.9 Asociación de la expresión intracitoplasmática de VEGF y MMP-9 por CMF en función de las principales características de los pacientes LLC-B. A) IMF

de VEGF en pacientes con diferente expresión CD38 y combinación de expresión Zap-70/CD38. La expresión negativa se representa en verde y en rojo la positiva, **B)** IMF de MMP-9 en pacientes con diferente riesgo citogenético. El grupo de bajo riesgo citogenético se representa en verde y el grupo de riesgo elevado queda representado en rojo.

Los análisis realizados mediante RTqPCR mostraron una correlación estadística entre la expresión génica de los receptores VEGF-R2 y VEGF-R3 en linfocitos B y la expresión de Zap-70 que presentaban los pacientes LLC-B (p-valor=0,026 y 0,007, respectivamente). Del mismo modo, se observó una tendencia estadística de mRNA VEGF-R3 en función de la expresión de Zap70 y/o CD38. Por último, se puso de manifiesto una mayor expresión mRNA VEGF-R3 en pacientes positivos para Zap-70 y CD38 (p-valor= 0,071) (Figura 4.10).

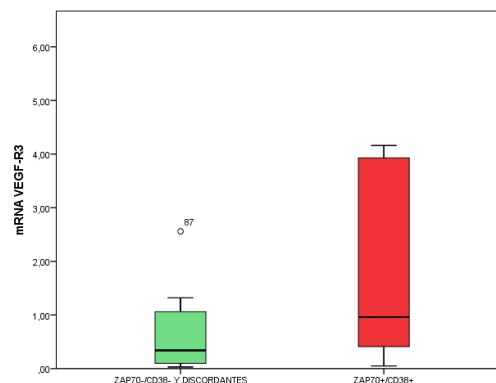


Figura 4.10 Expresión de mRNA del gen VEGF-R3 en linfocitos B de pacientes LLC-B estratificando a los pacientes en función de positividad para Zap70 y/o CD38 (representado en rojo) y pacientes Zap70 negativo/CD38 negativo (verde); p-valor= 0,071 (U-Mann Whitney test).

Adicionalmente, realizamos un análisis de correlación (Spearman) de la expresión de bFGF de los pacientes LLC-B con las principales características clínicas, biológicas y moleculares. Obtuvimos una correlación positiva de la expresión de bFGF con la

expresión de la proteína Zap-70 y del antígeno CD38 (coeficiente de correlación de Spearman 0,039 y 0,032, respectivamente) (Figura 4.11). El test mostró diferencias estadísticamente significativas con un p-valor= 0,047 para la expresión de la proteína Zap-70 y p-valor= 0,049 para la expresión del antígeno CD38.

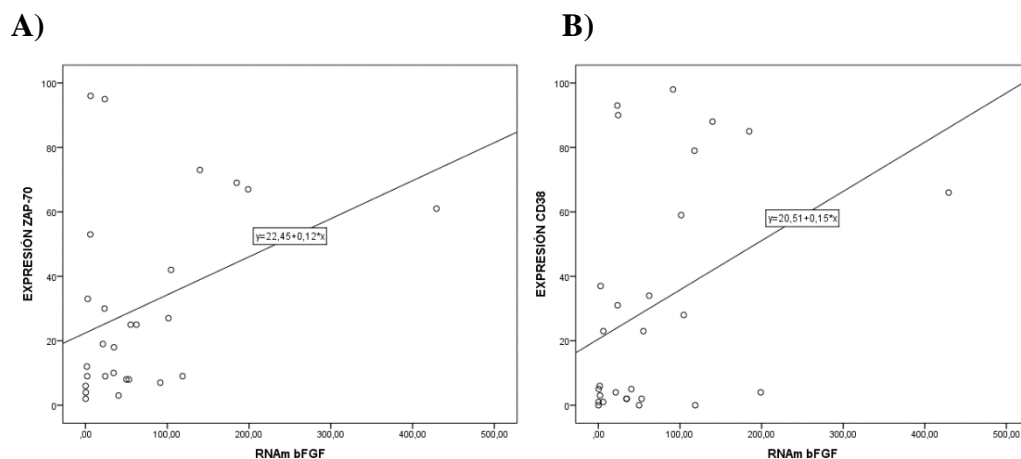


Figura 4.11 Correlación de la expresión de bFGF con la expresión de Zap-70 y CD38 de los pacientes LLC-B.

El test no paramétrico (U-Mann Whitney), mostró diferencias estadísticamente significativas de los niveles de mRNA del bFGF en pacientes con diferente expresión de Zap-70 y CD38. Se observó una mayor expresión de bFGF en los pacientes Zap-70 positivos (p-valor=0,043) y CD38 positivos (p-valor=0,035). Adicionalmente, obtuvimos una tendencia estadística positiva para la expresión génica del bFGF en los pacientes con positividad conjunta para ambas moléculas (Zap70+/CD38+) o expresión negativa (Zap70-/CD38- y discordantes), observándose una mayor expresión de bFGF en el grupo de pacientes con expresión positiva (Zap70+/CD38+). Respecto a la morfología, los resultados reflejaron una mayor expresión de bFGF en pacientes con morfología atípica (p-valor=0,037) que en pacientes con morfología típica. Los resultados quedan plasmados en la figura 4.12.

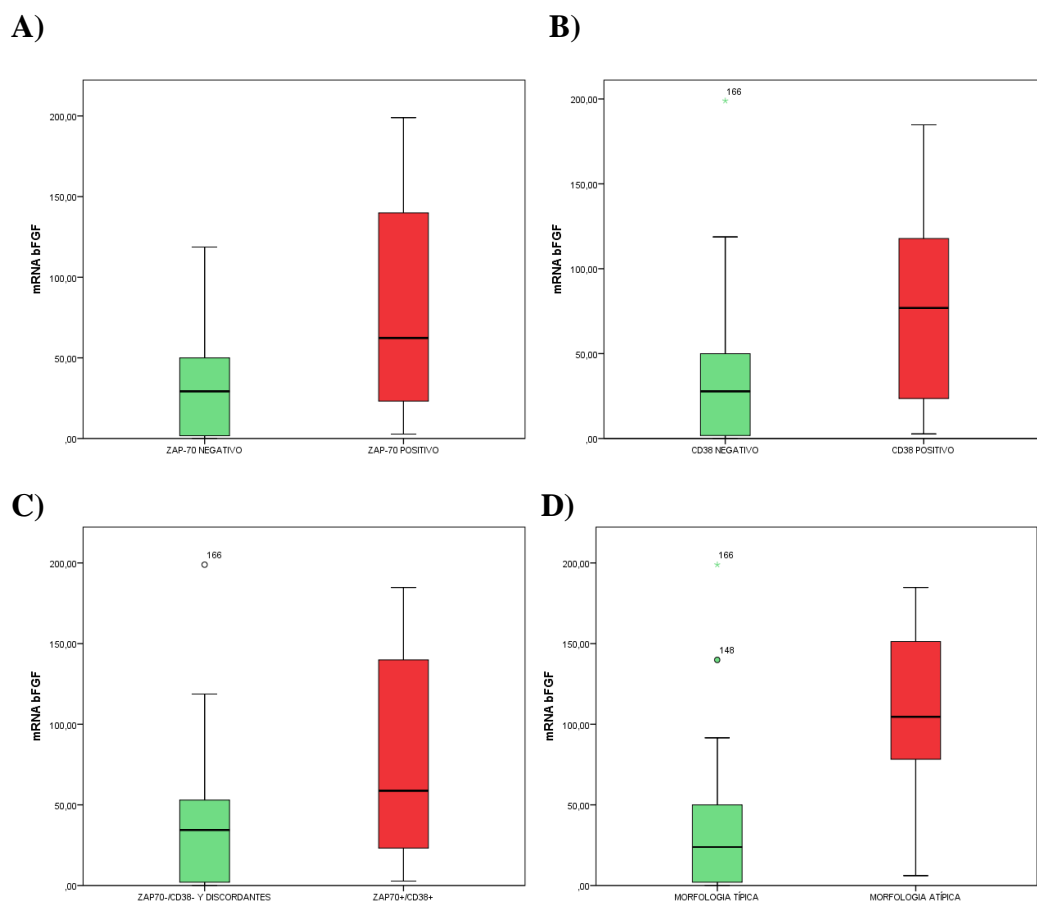


Figura 4.12 Expresión de mRNA del gen bFGF en linfocitos B de pacientes LLC-B:

A) Zap-70 positivo representado en rojo ($\geq 20\%$ células que expresan la proteína) versus Zap-70 negativo ($< 20\%$) representado en verde; p-valor= 0,043, **B)** CD38 positivo ($\geq 20\%$ células que lo expresan) en rojo versus CD38 negativo ($< 20\%$) en verde; p-valor=0,035, **C)** Zap-70 negativo y CD38 negativo junto con el grupo discordante (verde), es decir, Zap70-/CD38- o Zap70-/CD38+ versus positividad para ambas moléculas (rojo); p-valor n.s, **D)** Morfología típica (verde) versus atípica (rojo); p-valor=0,037. Test aplicado U-Mann Whitney.

Los análisis realizados con los valores hematológicos y bioquímicos de los pacientes en sangre periférica (recuento de linfocitos, leucocitos, plaquetas, LDH, Hemoglobina y $\beta 2$ -microglobulina al diagnóstico) y la expresión de los tres receptores de

VEGF y bFGF, reflejaron una relación estadísticamente significativa mediante la aplicación de regresión lineal. La significación estadística se muestra en la siguiente tabla:

Asociación VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3 con los valores hematológicos	p-valor
mRNA VEGFR3-LDH	0,035
mRNA VEGFR3-Plaquetas	<0,001
mRNA VEGFR3-Linfocitos	0,03
mRNA VEGFR3-Leucocitos	0,03
IMF VEGFR3-LDH	0,021
mRNA VEGFR2-Hb	0,016
mRNA bFGF-Hb	0,025
% VEGFR1-LDH	0,006

Tabla 4.9 Relación de la expresión de los receptores de VEGF Y bFGF con los valores hematológicos y bioquímicos de los pacientes LLC-B.

2.5 Impacto en la supervivencia

El análisis de la relación entre la supervivencia y los valores de expresión obtenidos de los tres receptores del VEGF y del bFGF, junto con las principales características clínicas de los pacientes LLC-B estudiados, mostraron resultados estadísticamente significativos (Tabla 4.10).

Aunque la intensidad de los receptores angiogénicos, de VEGF intracitoplásmico y de la MMP9 se asoció a un menor intervalo libre de tratamiento, dichas diferencias no alcanzaron un valor estadísticamente significativo.

Asociación expresión receptores de VEGF y bFGF con característica clínico-moleculares de los pacientes LLC-B		p-valor
ZAP-70	IMF VEGF-R1	0,014
CD38	IMF VEGF-R1	0,024
Adenopatías	bFGF IMF	0,038
	VEGF-R1	0,054
Estadio Rai	IMF VEGF-R1	0,061

Tabla 4.10 Relación de la expresión de los receptores de VEGF Y bFGF con las características clínico-moleculares de los pacientes LLC-B.

3. Estudio del papel de la vía VEGF/VEGF-R en la apoptosis y migración celular de la LLC-B y su correlación con la expresión de MMP-9, CXCR4, CCR7 y CD49d

3.1 Implicación de la vía VEGF/VEGF-R en la viabilidad celular mediante la utilización de inhibidores específicos

Con el objetivo de dilucidar el papel de la vía VEGF/VEGF-R en la viabilidad celular, realizamos ensayos funcionales en LLC-B mediante la medición de la susceptibilidad a la apoptosis mediada por fármacos que afectan a dicha vía. Los resultados observados en los ensayos realizados en la línea celular Mec-1 y en linfocitos B de pacientes, mostraron un aumento de la viabilidad celular por parte de VEGF-165 a través de la inhibición de la apoptosis.

El aumento de la viabilidad debido al tratamiento con VEGF-165 fue de un 10%, obteniéndose el efecto máximo entre las 24-48 horas de incubación. Por el contrario, el tratamiento de las células B leucémicas con inhibidor de VEGF-R2 (Tyrphostin SU1498) provocó una disminución de la viabilidad celular a las 24h, 48h y 72h de tratamiento (39.82%, 66.79% y 93.93%) respecto a los controles sin tratar. Adicionalmente, se observó que la re-administración de VEGF-165 provocó la recuperación de la viabilidad (Figura 4.13). Los resultados fueron reproducibles tanto en las células B de pacientes con enfermedad en estadios iniciales como en estadios avanzados.

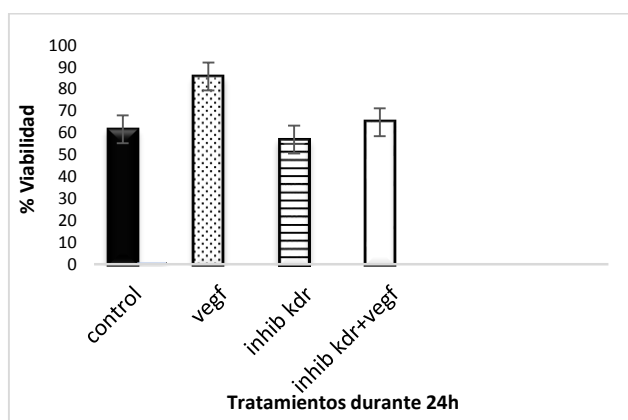


Figura 4.13 Porcentaje de viabilidad de la línea celular Mec-1 tratada 24h con VEGF-165 y el inhibidor de VEGF-R2. Tras el tiempo de incubación se determinaron los porcentajes de apoptosis celular mediante CMF. La viabilidad celular fue calculada con el uso de IP/Anexina V.

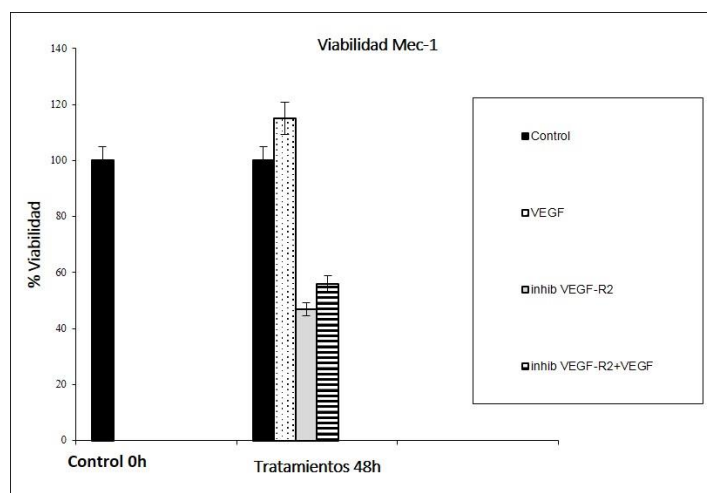


Figura 4.14 Viabilidad de Mec-1 tras tratamiento durante 48h. La viabilidad celular se vio aumentada un 10 % al tratar las células con VEGF (50 ng/ml), sin embargo, el tratamiento con el inhibidor de VEGF-R2 (70ng/ml) redujo un 66,79 % la viabilidad celular.

Al realizar los ensayos de viabilidad con linfocitos B normales como grupo control (linfocitos B de individuos sanos aislados a partir de *buffy coats*), tan sólo se observó un ligero incremento de viabilidad celular a las 24h de tratamiento con VEGF-165 (2%), siendo esta diferencia acusadamente menor que en los pacientes estudiados y que en Mec-1. Así, el VEGF presentó un mayor efecto antiapoptótico en las células de la LLC que en los linfocitos B normales.

Para llevar a cabo los estudios del efecto de la estimulación del VEGF y de las posibles vías implicadas en la apoptosis de las células LLC-B mediante CMF, realizamos cultivos celulares tratados además de con VEGF-165 y con Tyrphostin SU1498 (inhibidor de VEGF-R2 implicado en la vía ERK/MAPK), con inhibidores de diferentes MAPK kinasas como son wortmanin1628 y LYS294002 (PI3K/Akt), PD98059 (P42/44 MAPK), SB203580 (p38) y SP600125 (JUNK).

Los resultados obtenidos mostraron que la ruta PI3K/Akt, en primer lugar y la ruta JNK, en segundo término, son las más implicadas en el proceso de supervivencia celular. Su inhibición produjo un descenso de la viabilidad del 37% en el caso de PI3K/Akt y del 30% para JNK.

3.1.1 Efecto del microambiente celular en la supervivencia de células LLC-B

Con el objetivo de evaluar el efecto del microambiente celular sobre la inhibición de la apoptosis mediada por VEGF en células de LLC-B, co-cultivamos células primarias provenientes de pacientes y células Mec-1 en contacto con las líneas celulares HK (células dendríticas foliculares) NKtert (células derivadas de estroma medular). Posteriormente, llevamos a cabo tratamientos con diferentes fármacos e inhibidores a distintas concentraciones y tiempos de exposición.

Los resultados obtenidos mostraron que el efecto del microambiente generado por el contacto celular de los linfocitos B neoplásicos en suspensión y la monocapa de células HK provoca una mejoría de la viabilidad en el paciente LLC-B respecto a las células neoplásicas aisladas en los diferentes tiempos de exposición con VEGF-165. Así, las

células en co-cultivo con células HK mostraron un mayor incremento de viabilidad respecto a las células sometidas a VEGF exógeno. El tratamiento con VEGF mejoró la supervivencia celular, observándose un mayor incremento cuando se encontraban en co-cultivo con células HK (2-6% tratadas con VEGF y 35% en co-cultivo) (Figura 4.15).

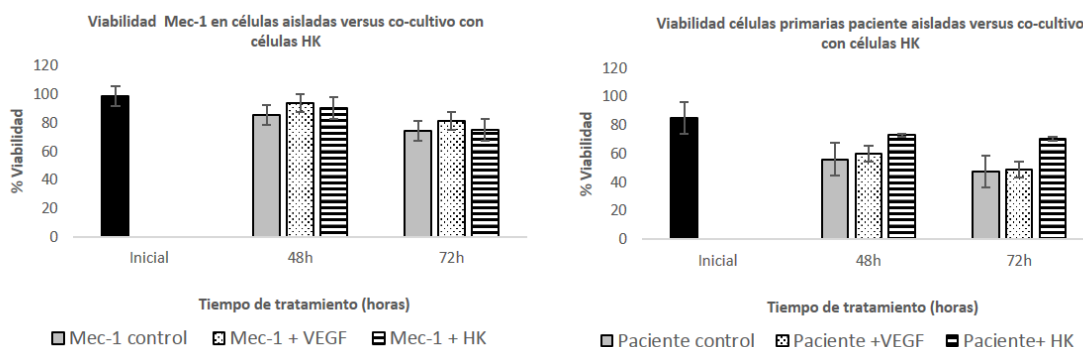


Figura 4.15 Porcentaje de viabilidad celular de Mec-1 y pacientes LLC-B en estadio avanzado de enfermedad tratados con VEGF-165 durante diferentes tiempos de exposición. Las células neoplásicas fueron cultivadas de forma aislada y en co-cultivo con la línea celular HK. El sistema de co-cultivo mostró un aumento de viabilidad en las células primarias de los pacientes.

Mediante la línea celular NKtert estudiamos el efecto del microambiente provocado por el contacto de las células B neoplásicas y las células estromales. Comparamos la viabilidad celular obtenida al tratar las células leucémicas con inhibidores de quinasa (como el Sorafenib), tanto cultivadas de forma aislada, como co-cultivadas con NKtert. Para los ensayos se utilizaron tanto la línea celular Mec-1 como linfocitos B de pacientes LLC-B con diferentes características clínicas.

Con las condiciones óptimas de cultivo obtenidas, la comparación de ambos sistemas de cultivo mostró un efecto protector del microambiente, observándose una gran mejoría en la viabilidad celular. En las células B controles (células sin tratamiento), las células co-cultivadas mostraron mejoría de la viabilidad celular con respecto a las células

aisladas. Adicionalmente, las muestras tratadas con el inhibidor de multiquinasa Sorafenib en co-cultivo fueron más resistentes a la apoptosis espontánea que las células neoplásicas tratadas y cultivadas de forma aislada, tanto a las 48h como a las 72 horas (Figura 4.16).

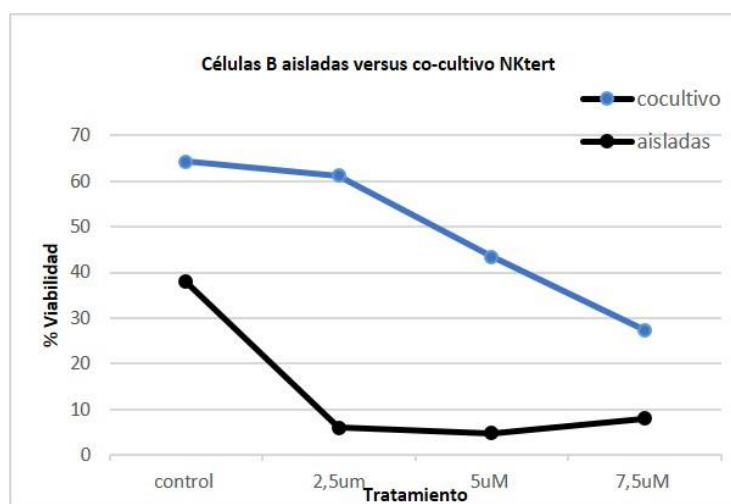
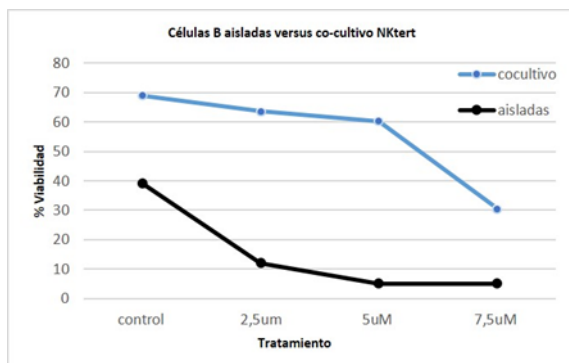


Figura 4.16 Efecto protector de la línea celular NKtert sobre la apoptosis de células LLC-B. Condiciones de cultivo celular según kurtova y cols (119) (5×10^4 cells/ml NKtert y 5×10^6 cells/ml B neoplásicas). Células B neoplásicas tratadas con Sorafenib durante 48h.

Los experimentos *in vitro* con ambos sistemas de cultivo celular, mostraron que las células estromales protegen a los linfocitos neoplásicos de la apoptosis. La adhesión al estroma parece conferir resistencia a la apoptosis inducida por estos fármacos. Los estudios realizados ofrecen resultados preliminares sobre la influencia del microambiente en la quimiosensibilidad *in vitro* a ciertos fármacos que requiere un mayor conocimiento (Figura 4.17).

A)



B)

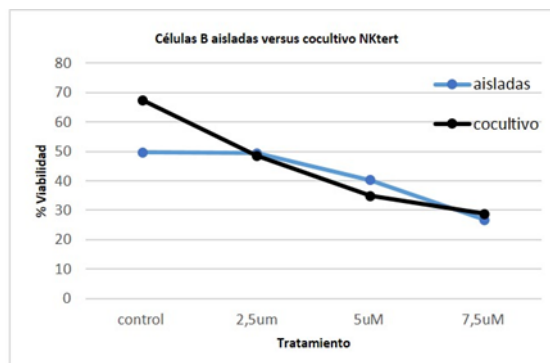


Figura 4.17 Cinética de inducción de apoptosis por Sorafenib en dos pacientes LLC-B con diferentes características clínicas. A) Forma no progresiva, B) forma progresiva. Las células B aisladas (línea en color negro) y co-cultivadas con la línea celular NKtert (azul), fueron incubadas de 0 a 72h en presencia del inhibidor multiquinasasa a diferentes dosis (2,5 µM, 5µM y 7,5 µM). Se consideraron apoptóticas las células Anexina V positivas.

3.2 Implicación de la vía VEGF/VEGF-R en la migración celular y expresión de receptores de quimiocinas CXCR4, CCR7 y CD49d

3.2.1 Influencia en la expresión de las quimiocinas CXCR4, CCR7 y CD49d

Este estudio fue realizado empleando linfocitos B de la línea celular neoplásica Mec-1 así como células primarias de 34 pacientes LLC-B en condiciones especiales de cultivo celular (monocapa celular de células endoteliales de cordón umbilical HUVEC en contacto con las células leucémicas en suspensión en cámaras *transwell* especiales, siguiendo las indicaciones descritas en el apartado de material y métodos).

Los resultados obtenidos por CMF en el cultivo celular de las células B neoplásicas tras el tratamiento con VEGF-165, inhibidor VERGFR2/KDR y VEGF-165 exógeno junto con el inhibidor para potenciar su efecto mostraron una elevada variabilidad de

expresión basal de CXCR4, CCR7 y CD49d (cultivos sin estímulos utilizados como grupo control).

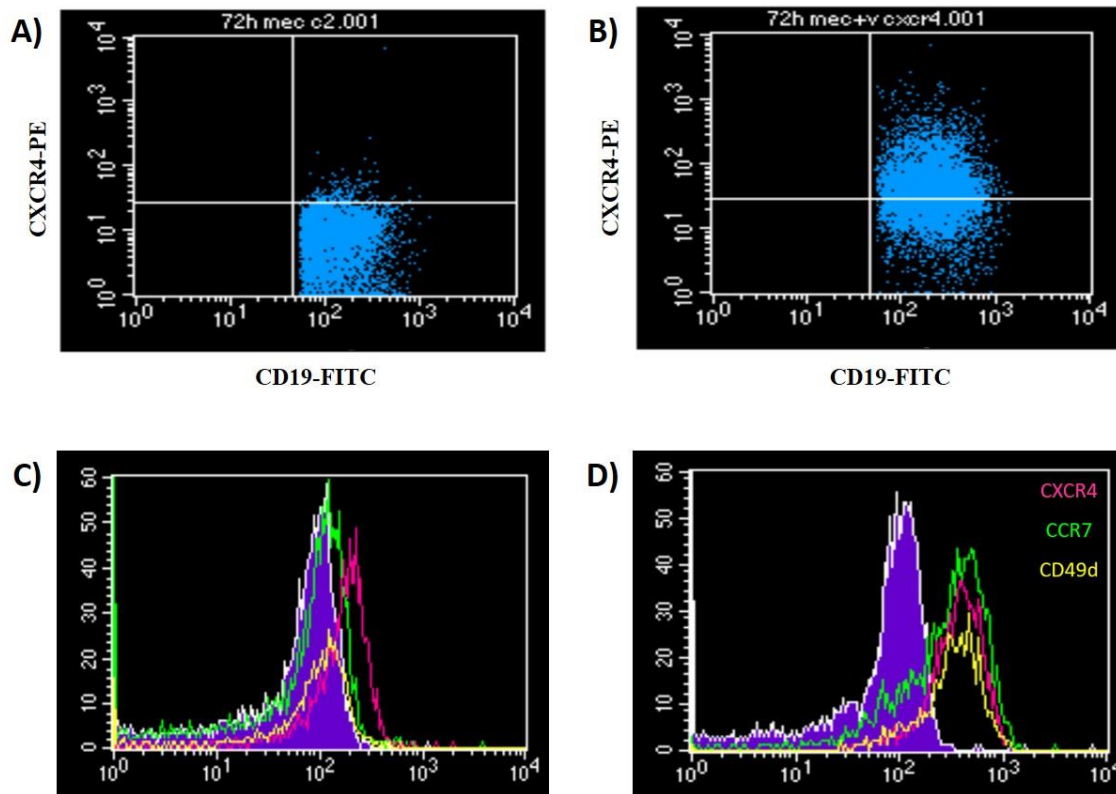


Figura 4.18 Análisis de la expresión superficial de membrana de quimiocinas en células B de la línea celular Mec-1. **A)** Niveles de expresión de CXCR4 en células control (ausencia de tratamiento), **B)** niveles de expresión de CXCR4 en células tratadas con VEGF-165, **C)** IMF de CXCR4 (representado en rosa), CCR7 (verde) y CD49d (amarillo) en células control, y **D)** IMF de CXCR4, CCR7 y CD49d en células tratadas con VEGF-165.

Mediante la aplicación de pruebas estadísticas para muestras emparejadas, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de CXCR4 (IMF) de las células B neoplásicas de los pacientes tratados con VEGF-165 con respecto a la expresión obtenida en las células en ausencia de tratamiento (tomados como control). Así, las células tratadas de VEGF-165 mostraron una expresión de CXCR4 superior a las

células sin tratar (media $9,64 \pm 95$, p-valor= 0,028; Wilcoxon test), en términos de intensidad media de fluorescencia (Tabla 4.11). Sin embargo no se apreció incremento significativo en el porcentaje de células que expresaban dicho receptor.

	Niveles basales de expresión (IMF)		Niveles de expresión tras el tratamiento VEGF	
	Mediana (rango)	Media (rango)	Mediana (rango)	Media (rango)
CXCR4	60,21 (27,26-770,93)	123,13(27,26-770,93)	62,36 (32,00-932,27)	132,67(32,00-932,27)
CCR7	59,94 (11,40-87,63)	77,52 (14,89-760,03)	50,76 (9,00-89,74)	77,68(14,53-644,64)
CD49d	57,06 (23,89-97.,7)	77,07(16,93-589,58)	57,37 (32,57-97,82)	82,11(18,63-644,92)

Tabla 4.11 Expresión de CXCR4, CCR7 y CD49d en células B control y células tratadas con VEGF de pacientes LLC-B.

Adicionalmente, el tratamiento con el inhibidor de VEGF-R2 se asoció a una reducción significativa en el porcentaje de células que expresaban CXCR4 respecto al grupo control (media $-6,62 \pm 22,8$, p=0.013), También se observó una tendencia estadística a la recuperación de dicho porcentaje al adicionar VEGF-165 (media $3,71 \pm 22$, p= 0.1) (Figura 4.19).

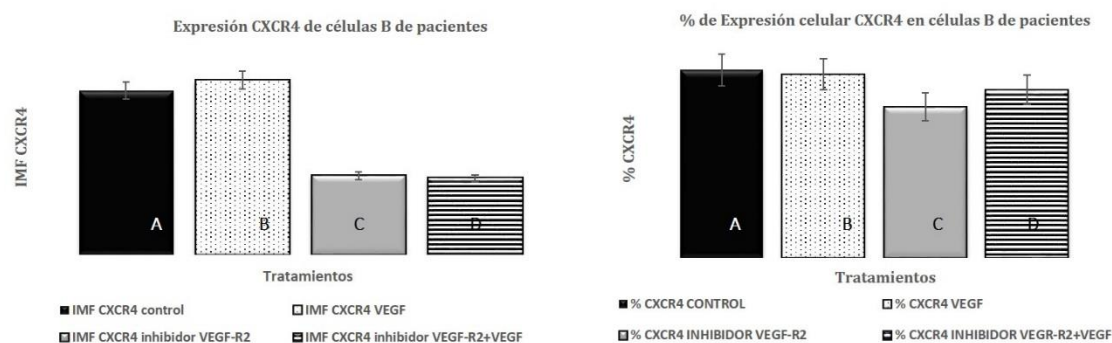


Figura 4.19 Expresión de CXCR4 en células primarias de 34 pacientes tras tratamiento con VEGF-165 (50 ng/ml), con inhibidor de VEGF-R2 (70ng/ml) y con ambos simultáneamente. A: Células control, B: células tratadas con VEGF-165, C: células tratadas con inhibidor VEGF-R2, D: inhibidor VEGF-R2 y VEGF-165 simultáneamente.

La IMF se vio aumentada significativamente al tratar las células con VEGF-165 (p-valor= 0,029) y reducida tras el tratamiento con inhibidor de VEGF-R2 (p-valor=0,079). El porcentaje de células que expresaron CXCR4 se vio significativamente reducido (p-valor=0.013) tras el tratamiento con el inhibidor VEGF-R2 y se produjo una recuperación del % de expresión al adicionar VEGF-165 (p-valor=0,1).

Respecto a la quimiocina CCR7 y CD49d, la administración de VEGF-165 no se asoció a un incremento significativo en el porcentaje de células que expresan CCR7 ni tampoco a la intensidad media de fluorescencia. No obstante, la aplicación del inhibidor del receptor 2 de VEGF si se vio asociada a una reducción en el porcentaje de células que expresan CCR7, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($-5,81 \pm 23,2$, $p=0.02$). Dicha expresión tiende a recuperarse con la administración de VEGF-165 ($4,6 \pm 17$, $p=0.014$) (Figura 4.20).

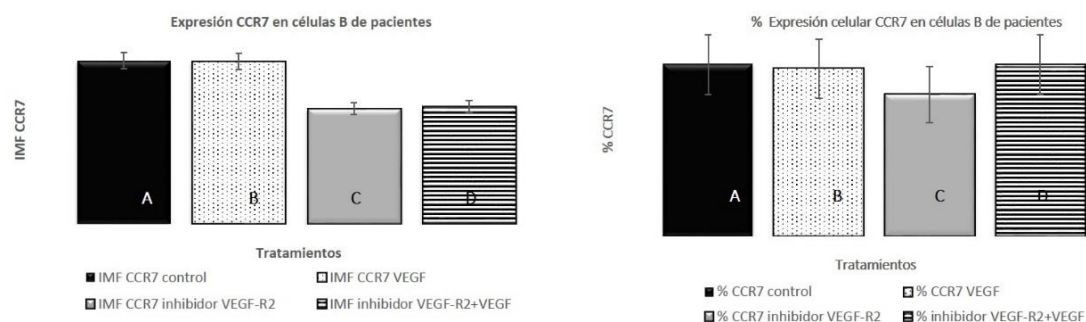


Figura 4.20 Expresión de CCR7 en células primarias de 34 pacientes tras tratamiento con VEGF-165 (50 ng/ml), con inhibidor de VEGF-R2 (70ng/ml) y con ambos simultáneamente. A: Células control, B: células tratadas con VEGF-165, C: células tratadas con inhibidor VEGF-R2, D: inhibidor VEGF-R2 y VEGF-165 simultáneamente.

El porcentaje de células que expresaron CCR7 se vio reducido significativamente tras el tratamiento con el inhibidor VEGF-R2 (p -valor=0.02) y se observó una recuperación con la administración de VEGF-165 (p =0.014). Los resultados mostraron que la exposición al inhibidor del receptor 2 del VEGF redujo el porcentaje de células que expresaban CXCR4 y CCR7 sugiriendo un papel regulador de este receptor en la expresión de estas quimiocinas.

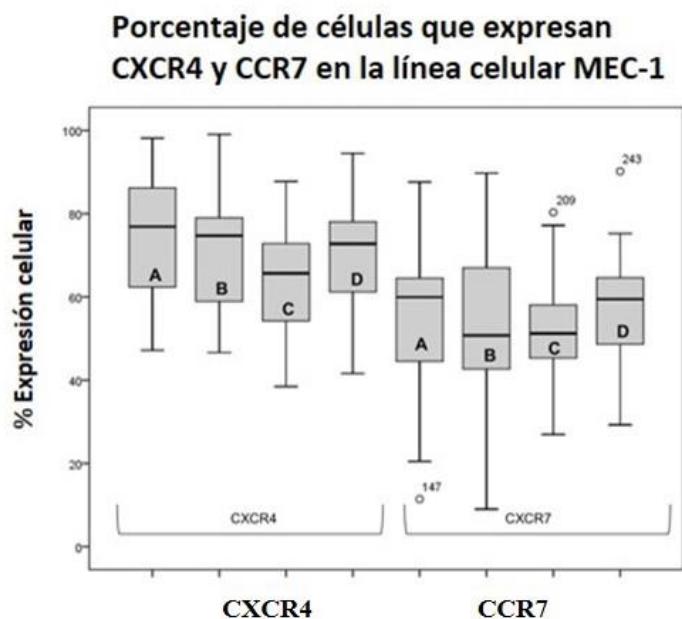


Figura 4.21 Porcentaje de células que expresan CXCR4 y CCR7 en la línea celular Mec-1. **A:** Células control, **B:** células tratadas con VEGF-165 (50ng/ml), **C:** células tratadas con inhibidor VEGF-R2 (70ng/ml), **D:** células tratadas con inhibidor VEGF-R2 y VEGF-165 simultáneamente.

Por el contrario, para la expresión de CD49d, la administración de VEGF exógeno no produjo variación significativa en el porcentaje ni en la intensidad de fluorescencia cuando fueron tratadas las células neoplásicas con VEGF-165. Se observó una reducción de la expresión de CD49d tras el tratamiento con inhibidor VEGF-R2 y una recuperación de la expresión al añadir VEGF-165, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, tanto en la línea celular Mec-1 como en pacientes LLC-B. (Figura 4.22).

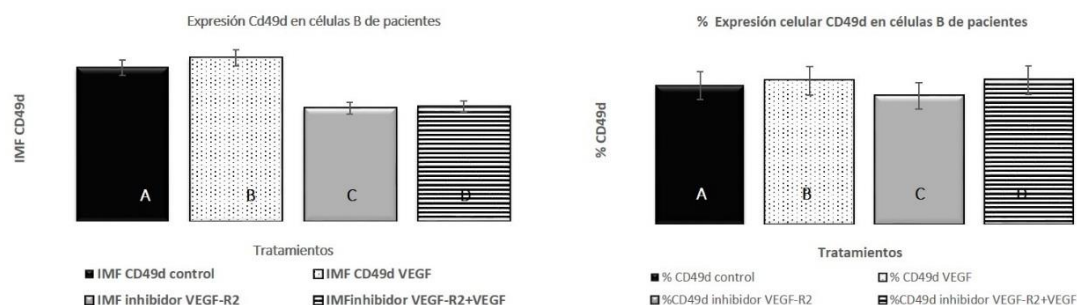


Figura 4.22 Expresión de CD49d en células primarias de 34 pacientes tras el tratamiento con VEGF-165 (50ng/ml), inhibidor de VEGF-R2 (70ng/ml) y ambos simultáneamente.

3.2.2 Influencia de la vía VEGF/VEGFR en la migración celular

Realizamos el estudio de migración celular en 34 pacientes con exposición a VEGF versus control según se expone en el apartado de material y métodos. Los resultados mostraron un incremento significativo en la migración de las células B neoplásicas tratadas con VEGF exógeno respecto a las células control ($27,66 \pm 69,97$; p-valor=0,03). El tratamiento con el inhibidor de VEGF-R2 mostró una reducción significativa del índice de migración ($-23,18 \pm 33,5$; p-valor=0,001), restaurándose la motilidad al adicionar VEGF-165 a las células tratadas con inhibidor VEGF-R2 ($36,04 \pm 39,33$; p-valor=0,001) (Figura 4.23). Los resultados fueron similares tanto en las células primarias de los pacientes como de la línea celular Mec-1.

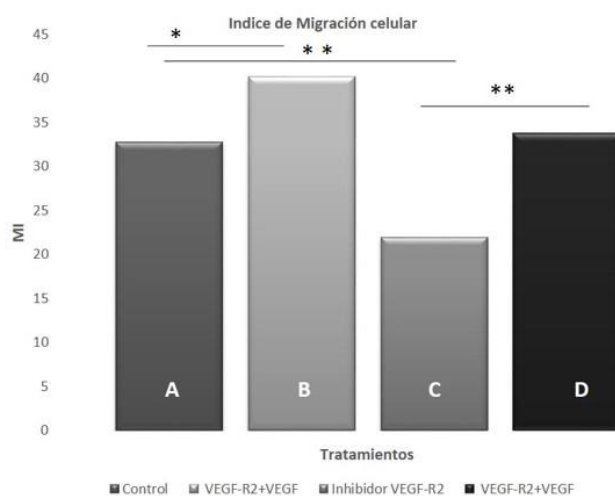


Figura 4.23 Índice de migración de los linfocitos B de 34 pacientes con LLC-B en función del tratamiento celular recibido. A) Células control, B) células tratadas con VEGF (50ng/ml), C) células tratadas con inhibidor VEGF-R2 (70 ng/ml), D) células tratadas con inhibidor VEGF-R2 y VEGF-165 simultáneamente. Test de Wilcoxon para muestras relacionadas con nivel de significación estadística de dos colas (bilateral) * $p < 0,005$ ** $p < 0,001$.

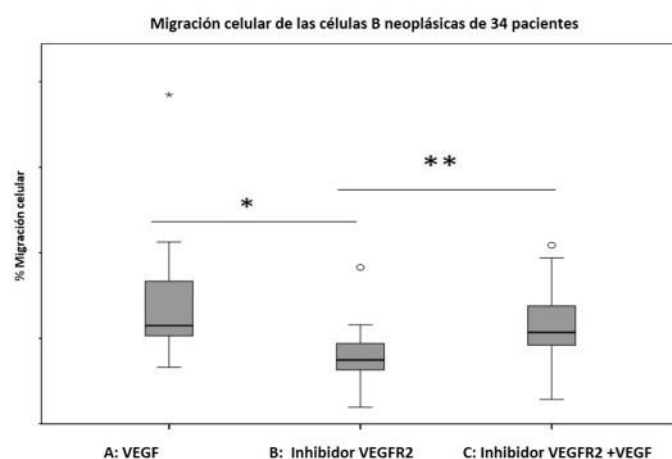


Figura 4.24 Migración celular en función del tipo de tratamiento recibido en células primarias de 34 pacientes LLC-B normalizado con el grupo control sin tratamiento.

A: Células tratadas con VEGF (50ng/ml) (p-valor=0,030), **B:** células tratadas con inhibidor VEGF-R2 (70 ng/ml), y **C:** células tratadas con inhibidor VEGF-R2 (p-valor=0,005) y con VEGF-165 simultáneamente (p-valor<0,001). Test de Wilcoxon para muestras relacionadas con nivel de significación estadística de dos colas (bilateral) *p<0,005 **p<0,001.

En conclusión, la estimulación con VEGF aumenta la migración transendotelial y la inhibición del receptor bloquea dicho efecto. La readministración de VEGF junto al inhibidor restauró la capacidad de migración. Los resultados sugieren que VEGF está implicada en la migración de las células B en la LLC mediante la regulación de los niveles de expresión de CXCR4 y CCR7.

Así mismo, se comparó la expresión de CXCR4 y la migración celular obtenida en la línea celular Mec-1 con la expresión y migración en linfocitos B normales de sujetos sanos aislados a partir de *buffy coats* como control. Los resultados mostraron que en Mec-1 tanto la migración como la expresión de CXCR4 aumentó cuando las células fueron estimuladas con quimiocinas (tanto para sdf-1, como exodus-2), siendo dosis-dependiente. También se observó que a mayor concentración, mayor migración y expresión de CXCR4. La expresión de CXCR4 y la migración celular también se vieron reducidas en presencia de la toxina pertúsica, lo cual apunta que dicha motilidad se realiza fundamentalmente, a través del citoesqueleto. En los linfocitos B normales, el tratamiento con VEGF-165 durante 24h y 48h aumentó la expresión de CXCR4 al igual que se incrementó la migración celular. Sin embargo, tanto el aumento de expresión de CXCR4 (IMF) como el de la migración celular fueron menores en las células B de donantes sanos respecto a la línea celular Mec-1 (Figura 4.25 y 4.26).

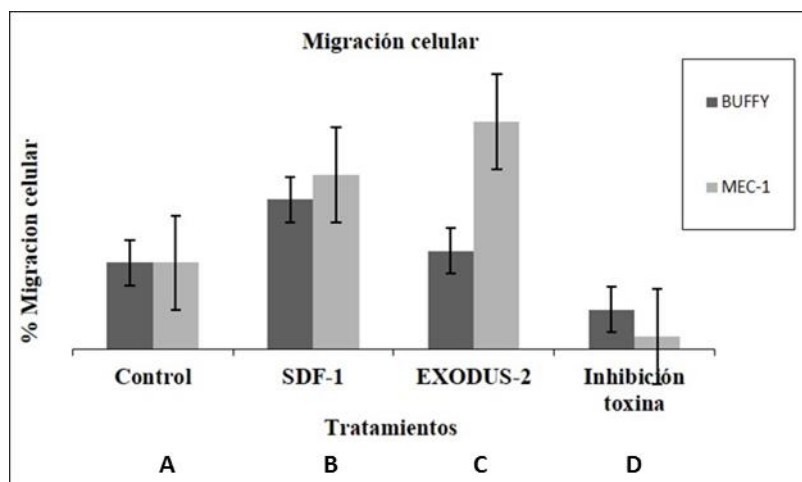


Figura 4.25 Migración celular en buffy coats de donantes sanos y en la línea celular MEC-1 respecto al tipo de tratamiento recibido. A) Sin estímulo, B) estimuladas con SDF-1 a una concentración de 100ng/ml (CXCR4 es receptor de SDF-1/CXCL12), C) estimuladas con exodus-2/CCL21 a una concentración de 100ng/ml (CCR7 es el receptor de exodus-2), y D) tratadas con toxina pertúsica. La migración celular de Mec-1 fue mayor que en el grupo control.

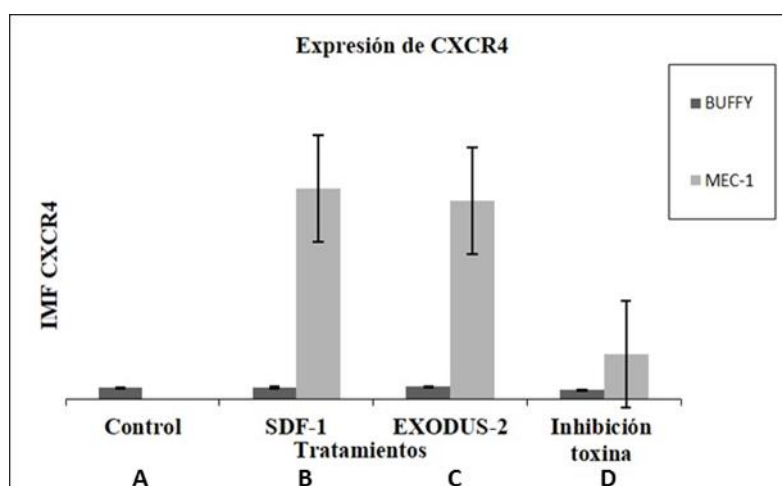


Figura 4.26 Expresión CXCR4 en buffy coats de donantes sanos y en la línea celular Mec-1 respecto al tipo de tratamiento recibido. A) Sin estímulo, B) estimuladas con SDF-1, C) estimuladas con exodus-2, D) tratadas con toxina pertúsica.

3.3 Análisis de la expresión de CXCR4 mediada por VEGF mediante técnicas de microscopía confocal y Western blot

Los resultados obtenidos mediante técnicas de microscopia confocal mostraron que la estimulación con VEGF-165 provocó un incremento en la intensidad de fluorescencia CXCR4 total y CXCR4 fosforilado (P-CXCR4), tanto en la línea celular Mec-1 como en células primarias de pacientes con LLC-B tras el tratamiento con VEGF-165 (Figura 4.27).

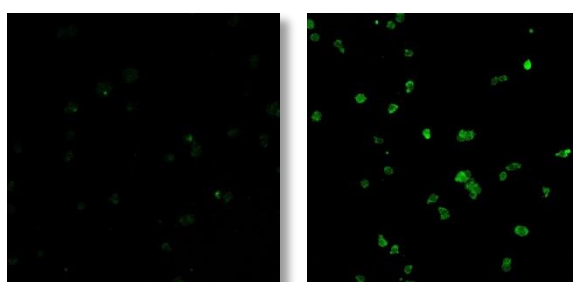
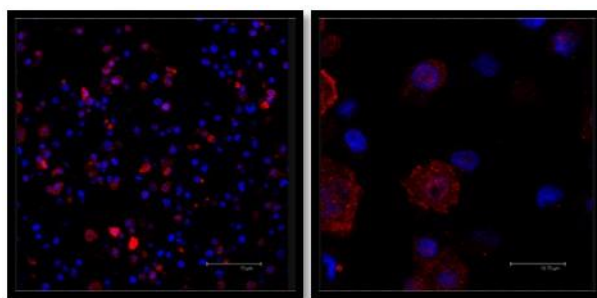


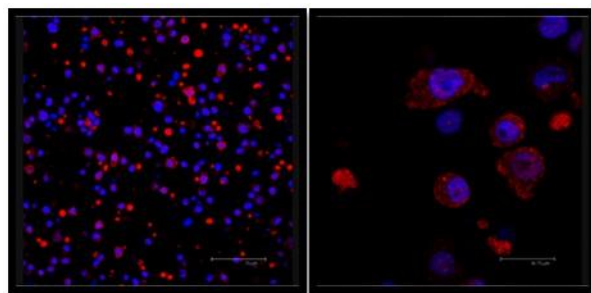
Figura 4.27 Intensidad de expresión de CXCR4 en Mec-1 mediante microscopia confocal. Células de la línea celular Mec-1 control en ausencia de tratamiento y tratadas 24h con VEGF-165 respecto al control (50ng/ml).

A)



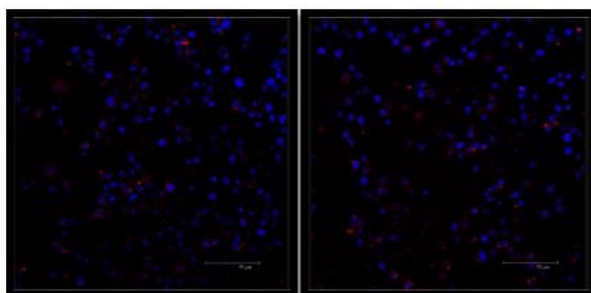
IMF CXCR4 MEC-1 CONTROL

B)



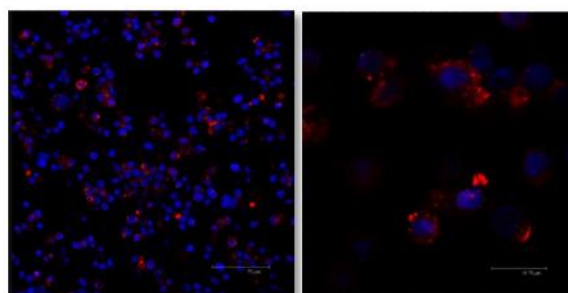
IMF CXCR4 MEC-1 VEGF

C)



IMF P-CXCR4 MEC-1 CONTROL

D)



IMF P-CXCR4 MEC-1 VEGF

Figura 4.28 Intensidad de expresión de CXCR4 y P-CXCR4 en Mec-1 mediante microscopia confocal. A) CXCR4 en células de la línea celular Mec-1 control en ausencia de tratamiento, B) CXCR4 en células tratadas 24h con VEGF-165 (50ng/ml),

C) P-CXCR4 Mec-1 control, **D)** P-CXCR4 Mec-1 tratadas 24h con VEGF-165 (50ng/ml). Nucleos teñidos con Hoescht (azul), CXCR4 y P-CXCR4 con Alexa Fluor-647 (rojo).

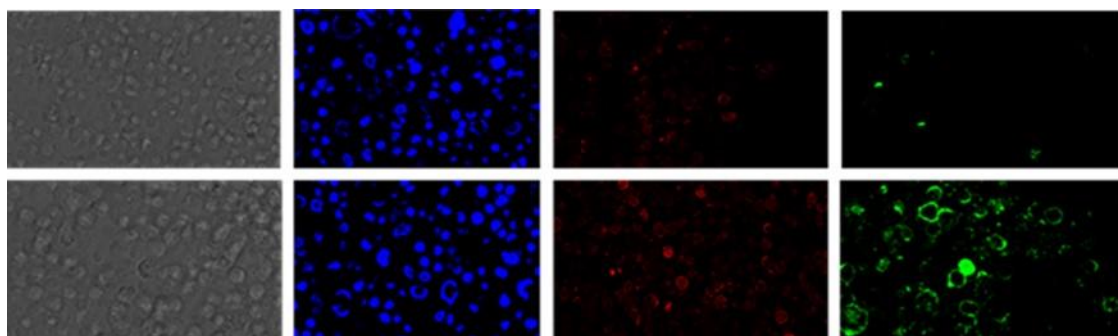
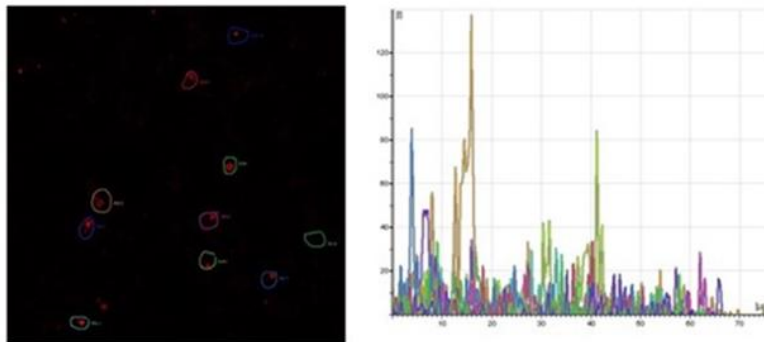
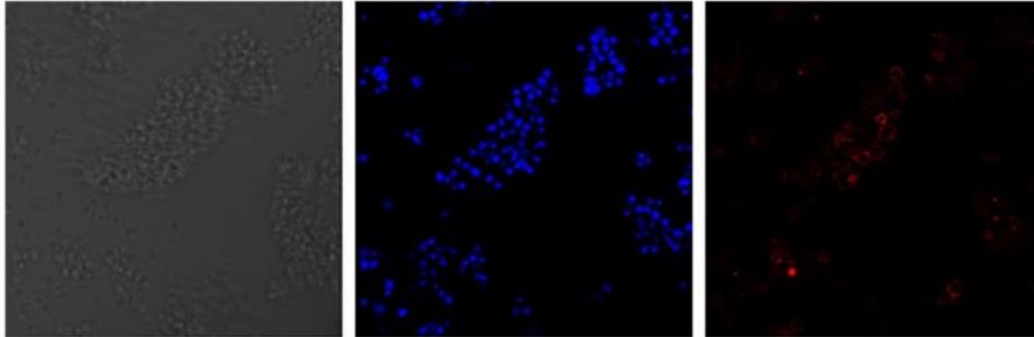


Figura 4.29 Intensidad de expresión de CXCR4 y P-CXCR4 de la línea celular Mec-1 mediante microscopia confocal. **A)** Células control, en ausencia de tratamiento, **B)** células tratadas 24h con VEGF-165 (50ng/ml). Nucleos teñidos con Hoechst 33258 (azul), CXCR4 con Alexa Fluor-647 (rojo) y P-CXCR4 con PE (verde).

Así mismo, se observó un aumento de intensidad de fluorescencia de CXCR4 y P-CXCR4 a diferentes tiempos de tratamiento con VEGF (50ng/ml), incrementándose la intensidad media conforme aumenta el tiempo de exposición (Figura 4.30). Este incremento se objetivaba de manera precoz (a las 2 horas), con un pico máximo a las 24 horas.

A)

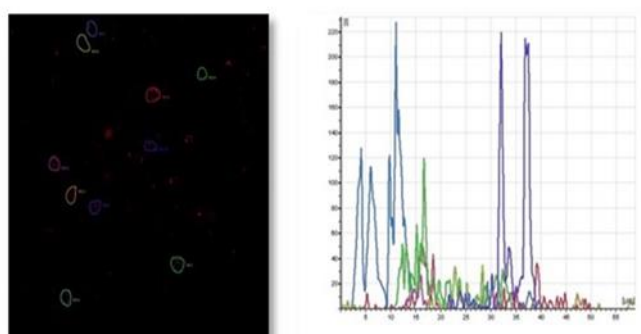
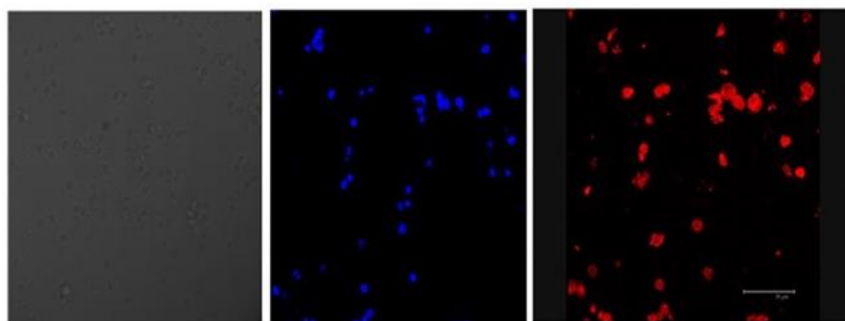


Channel 2

	ROI1	ROI2	ROI3	ROI4	ROI5	ROI6	ROI7	ROI8	ROI9	ROI10
Length	56,53 μm	63,53 μm	76,43 μm	55,50 μm	67,11 μm	57,15 μm	58,61 μm	61,64 μm	63,08 μm	67,28 μm
Mean Amplitude	2,89	3,25	6,22	2,43	2,78	5,23	3,84	2,62	2,04	1,88
Max. Amplitude	34,00	49,00	140,00	31,00	29,00	86,00	87,00	34,00	21,00	21,00
Min. Amplitude	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Average Deviation	3,75	4,38	8,58	3,27	3,39	6,51	4,76	3,14	2,49	2,49
Standard Deviation	5,71	7,87	16,32	4,86	4,57	10,16	8,44	4,63	3,58	3,55
Variance	32,59	61,99	266,25	23,66	20,87	103,28	71,22	21,47	12,84	12,59

IMF CXCR4 (rojo) 30 minutos VEGF=3,31

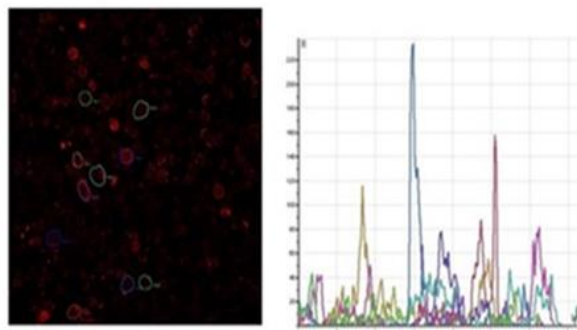
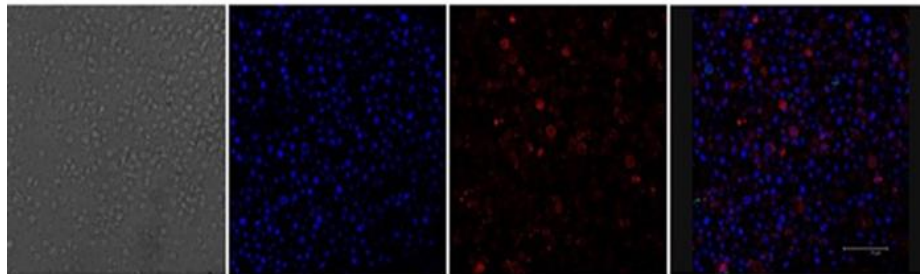
B)



Channel 2										
	ROI1	ROI2	ROI3	ROI4	ROI5	ROI6	ROI7	ROI8	ROI9	ROI10
Length	58,72 μm	50,20 μm	55,19 μm	53,10 μm	48,97 μm	58,26 μm	51,81 μm	58,45 μm	41,53 μm	47,78 μm
Mean Amplitude	0,03	0,06	0,28	0,32	1,09	1,82	16,12	3,93	10,32	12,34
Max. Amplitude	3,00	5,00	12,00	10,00	27,00	35,00	232,00	50,00	122,00	224,00
Min. Amplitude	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Average Deviation	0,07	0,12	0,52	0,59	1,92	2,78	23,48	5,41	11,86	19,15
Standard Deviation	0,26	0,41	1,30	1,39	3,86	4,99	35,64	9,01	16,89	38,51
Variance	0,07	0,16	1,69	1,94	14,87	24,87	1270,51	81,12	285,12	1483,40

IMF CXCR4 (rojo) 2h VEGF=5,72

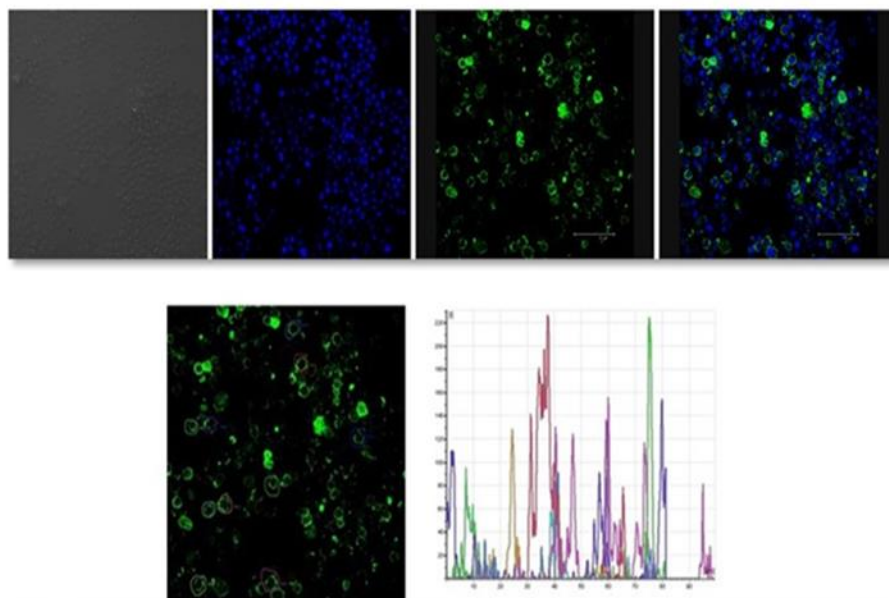
C)



Channel 2										
	ROI1	ROI2	ROI3	ROI4	ROI5	ROI6	ROI7	ROI8	ROI9	ROI10
Length	54,17 μm	63,41 μm	51,96 μm	74,06 μm	66,56 μm	69,37 μm	61,56 μm	55,48 μm	55,73 μm	63,51 μm
Mean Amplitude	1,32	3,44	12,16	9,86	9,46	3,12	10,00	8,78	4,11	5,90
Max. Amplitude	14,00	68,00	118,00	47,00	83,00	33,00	238,00	161,00	44,00	79,00
Min. Amplitude	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Average Deviation	1,84	4,81	13,73	10,03	10,10	3,74	15,35	11,93	5,23	9,44
Standard Deviation	2,67	7,81	19,13	11,94	15,14	5,14	34,40	21,65	7,56	15,03
Variance	7,15	60,96	365,88	142,55	229,35	26,42	1183,26	468,91	57,15	225,97

IMF CXCR4 (rojo) 24h VEGF=6,81

D)

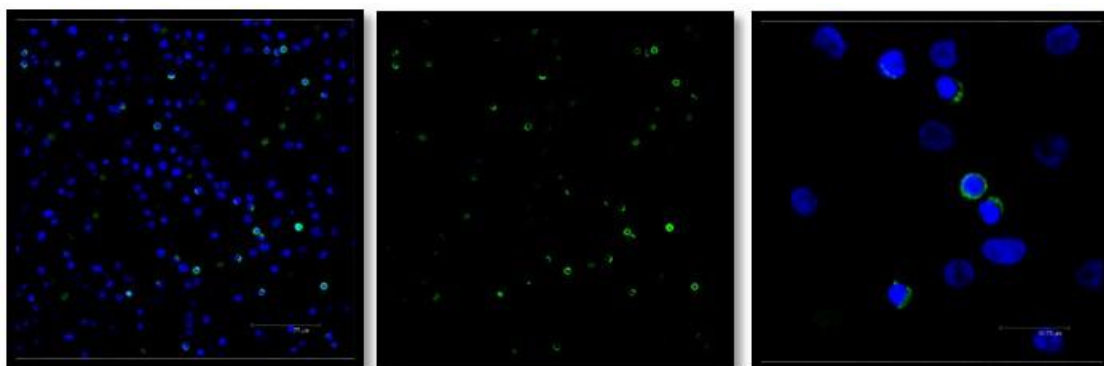


Channel 2										
	ROI 1	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9	ROI 10
Length	67,11 μm	78,73 μm	82,89 μm	69,20 μm	99,35 μm	83,53 μm	80,61 μm	80,53 μm	82,64 μm	81,22 μm
Mean Amplitude	3,84	2,54	3,14	1,81	11,11	0,79	2,77	17,99	5,45	10,17
Max. Amplitude	97,00	139,00	131,00	60,00	159,00	25,00	93,00	231,00	229,00	157,00
Min. Amplitude	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Average Deviation	6,82	4,31	5,72	3,10	15,66	1,36	4,69	28,74	9,36	15,73
Standard Deviation	13,46	13,61	15,08	7,48	24,85	2,66	10,79	45,10	27,43	25,55
Variance	181,17	185,33	227,48	55,96	617,32	7,07	116,52	2034,23	752,19	652,92

IMF P-CXCR4 (verde) 24h VEGF =5,96

Figura 4.30 Expresión diferencial de CXCR4 y P-CXCR4 de la línea celular Mec-1 tratada a diferentes tiempos con VEGF (50ng/ml). **A)** IMF de CXCR4 en células tratadas 30 minutos con VEGF-165 (50ng/ml), **B)** células tratadas 2 horas con VEGF-165 (50ng/ml), **C)** células tratadas 24 horas con VEGF-165 (50ng/ml), **D)** IMF de P-CXCR4 en células tratadas 24 horas con VEGF-165 (50ng/ml). Núcleos teñidos con Hoechst 33258 (azul), CXCR4 con Alexa Fluor-647 (rojo) y P-CXCR4 con PE (verde).

A)



B)

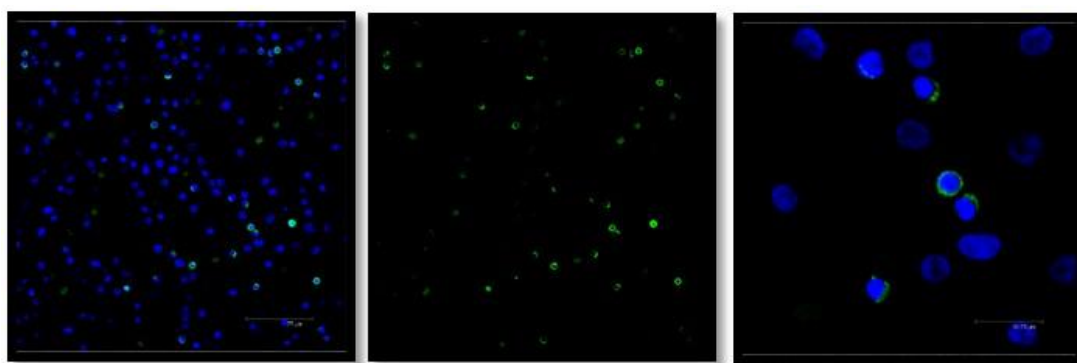
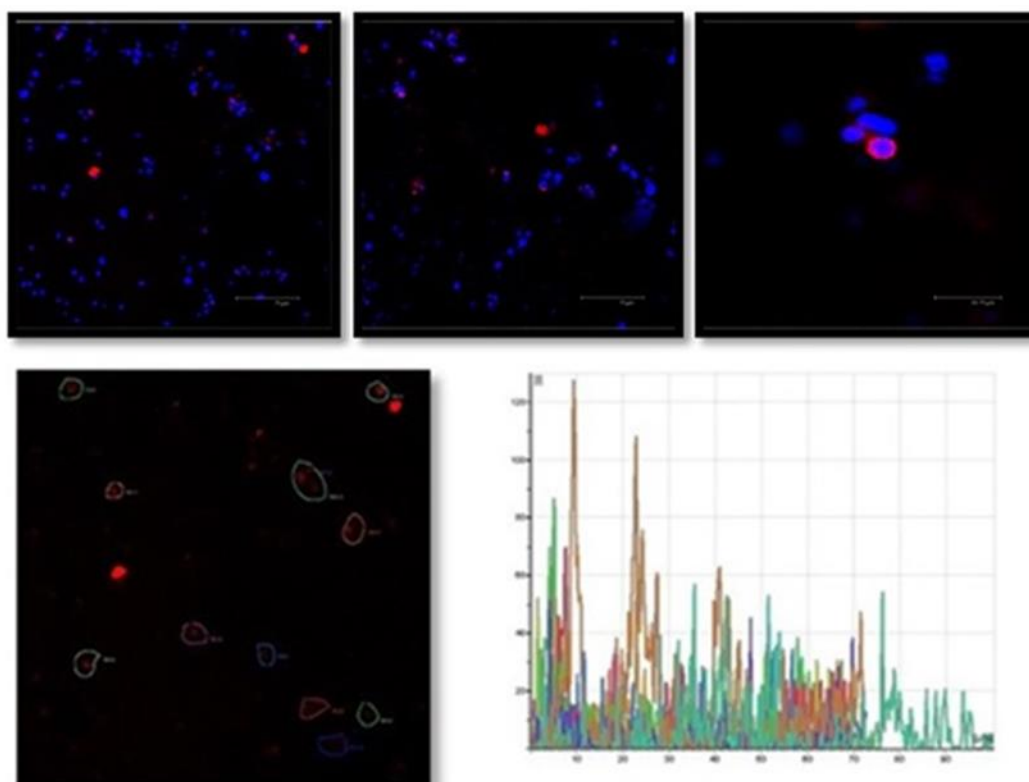


Figura 4.31 Intensidad de expresión de CXCR4 en paciente LLC-B mediante microscopia confocal. A) CXCR4 en células control en ausencia de tratamiento, B) CXCR4 en células tratadas 24h con VEGF-165 (50ng/ml). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (azul) y CXCR4 con PE (verde).

IV. Resultados

Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la modificación de la intensidad media de fluorescencia de CXCR4 y P-CXCR4 en los linfocitos B de individuos sanos tras el tratamiento con VEGF-165 a diferentes tiempos de incubación (30 minutos, 2h, 6h y 24horas) (Figura 4.32).

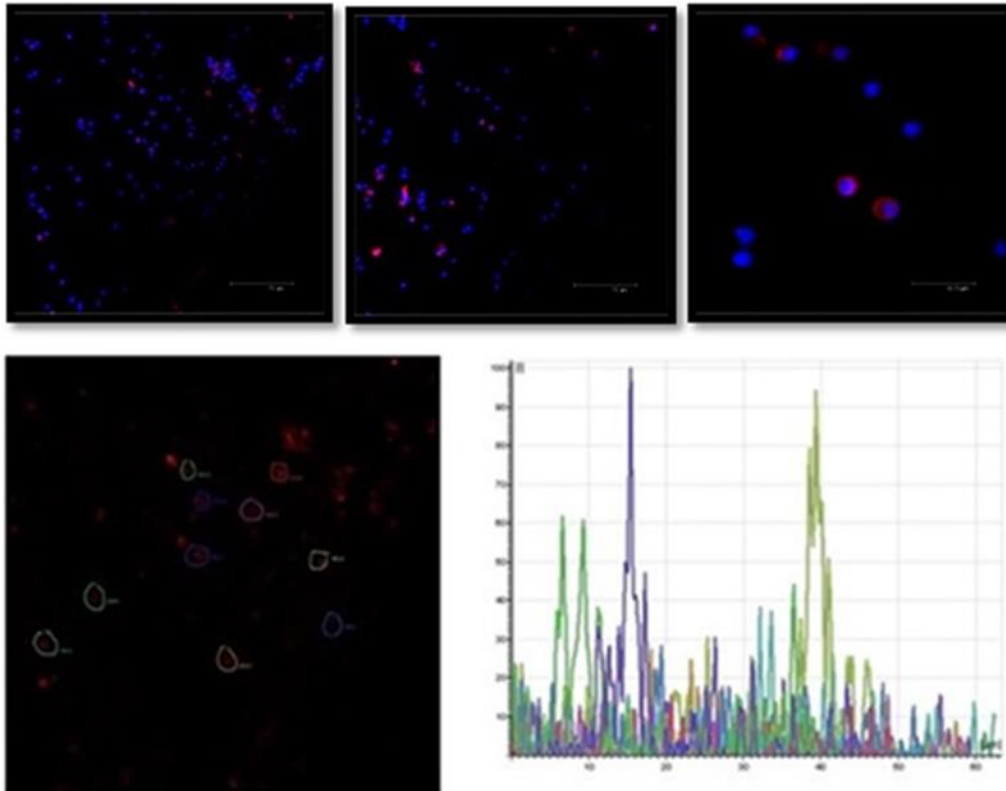
A)



Channel 2										
	ROI 1	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9	ROI 10
Length	66,69 μm	50,62 μm	48,67 μm	57,84 μm	66,10 μm	76,07 μm	56,73 μm	71,28 μm	58,11 μm	72,58 μm
Mean Amplitude	5,40	3,12	4,13	6,22	3,71	3,64	3,76	5,49	4,28	3,64
Max. Amplitude	84,00	31,00	68,00	54,00	33,00	53,00	35,00	71,00	71,00	52,00
Min. Amplitude	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Average Deviation	6,97	3,46	7,34	6,05	3,80	4,03	4,26	6,41	5,01	4,25
Standard Deviation	11,46	5,92	10,61	8,48	5,10	5,75	5,92	9,48	7,37	6,48
Variance	131,28	67,15	112,54	71,93	25,99	33,11	35,07	80,95	54,34	41,97

IMF CXCR4 control= 4,34

B)

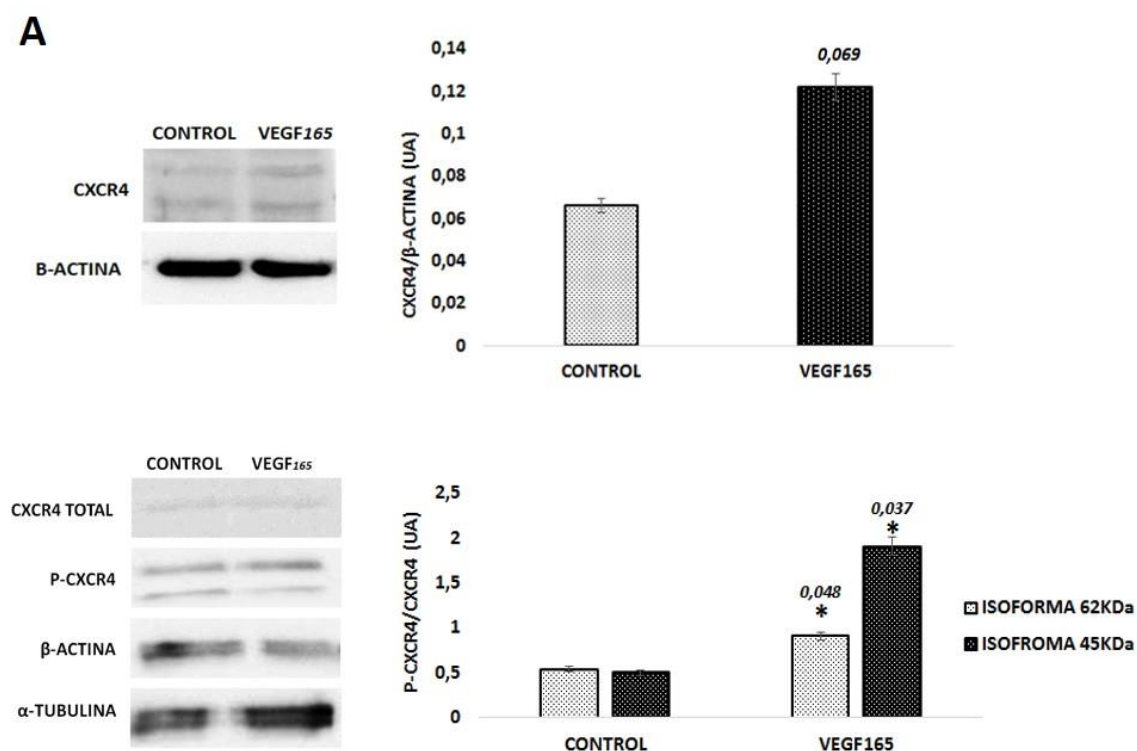


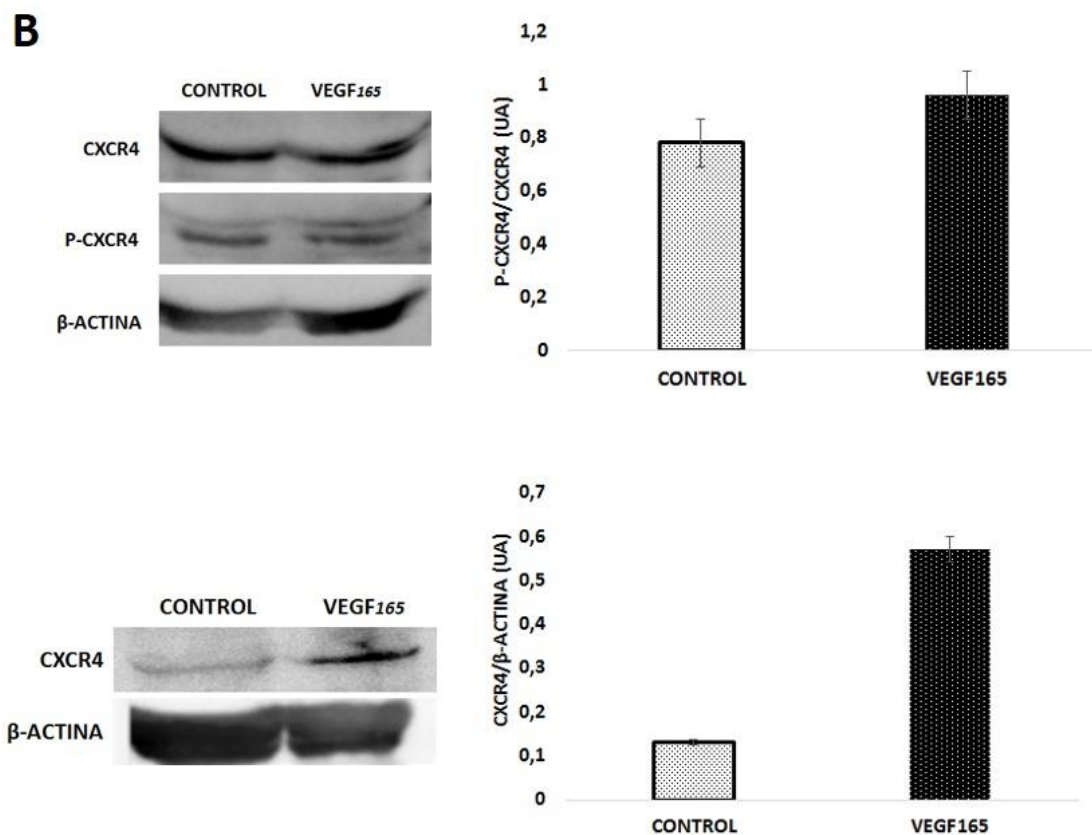
Channel 2										
	ROI 1	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9	ROI 10
Length	63,25 μm	59,74 μm	58,82 μm	42,36 μm	59,37 μm	50,80 μm	54,61 μm	42,81 μm	42,29 μm	45,37 μm
Mean Amplitude	0,92	1,96	2,61	3,12	1,48	8,27	3,27	1,36	8,01	7,26
Max. Amplitude	19,00	20,00	26,00	20,00	18,00	96,00	29,00	16,00	63,00	102,00
Min. Amplitude	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Average Deviation	1,43	2,29	3,76	3,54	2,00	9,45	3,82	1,79	8,78	8,75
Standard Deviation	2,48	3,57	4,40	5,41	2,87	15,23	4,94	2,64	12,40	13,50
Variance	6,76	11,39	19,40	29,28	8,22	252,87	24,38	6,57	156,29	182,33

IMF CXCR4 24h VEGF=3,82

Figura 4.32 Intensidad de expresión de CXCR4 en células B de donantes sanos. **A)** CXCR4 en células sin tratamiento, **B)** CXCR4 en células tratadas 24h con VEGF-165 (50ng/ml). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (azul) y CXCR4 con Alexa Fluor-647 (rojo).

Los análisis de expresión proteica mediante Western blot fueron realizados con la línea Mec-1. Los resultados de la cuantificación de CXCR4, mostraron un incremento estadísticamente significativo de los niveles de proteína total y fosforilada tras el tratamiento de las células con VEGF-165. La α -tubulina y la β -actina fueron tomadas como controles endógenos. Los ensayos realizados en pacientes LLC-B (n=4), también mostraron un aumento de expresión de CXCR4 en las muestras tratadas con VEGF-165 respecto a los controles sin tratar (Figura 4.33).





UA: Unidades arbitrarias.

Figura 4.33 Detección mediante WB de las proteínas CXCR4 y Phospho-CXCR4 en Mec-1 (A) y células primarias de pacientes (B) tras el tratamiento con VEGF-165 durante 24h. La detección de las proteínas fue realizada con el analizador de imagen *Image-Quant™ LAS4000* (GE healthcare). Las valoraciones densitométricas de cada proteína se determinaron con el *software Image Gauge 4.0*.

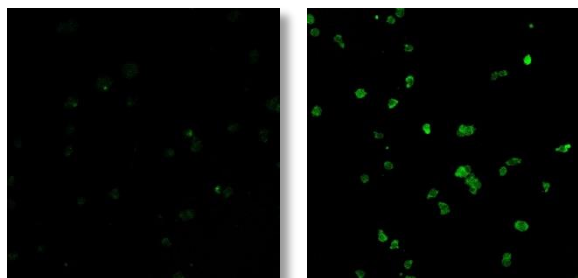
Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la proteína fosforilada CXCR4 en las células Mec-1 tratadas con VEGF-165 respecto a los controles sin tratar (p-valor=0,037 y 0,048; isoforma de 45KDa y 62KDa respectivamente; test de T-Student). La fosforilación de CXCR4 también se vio incrementada en las muestras tratadas con VEGF-165 respecto a las células control en las células primarias de los

pacientes con LLC-B (P-CXCR4/CXCR4=0,96 versus 0,78). No se aplicaron análisis estadístico en las células primarias de los pacientes, debido al número reducido de pacientes empleados en el estudio.

3.4 Co-localización de CXCR4-Lyn en los *lipid raft*

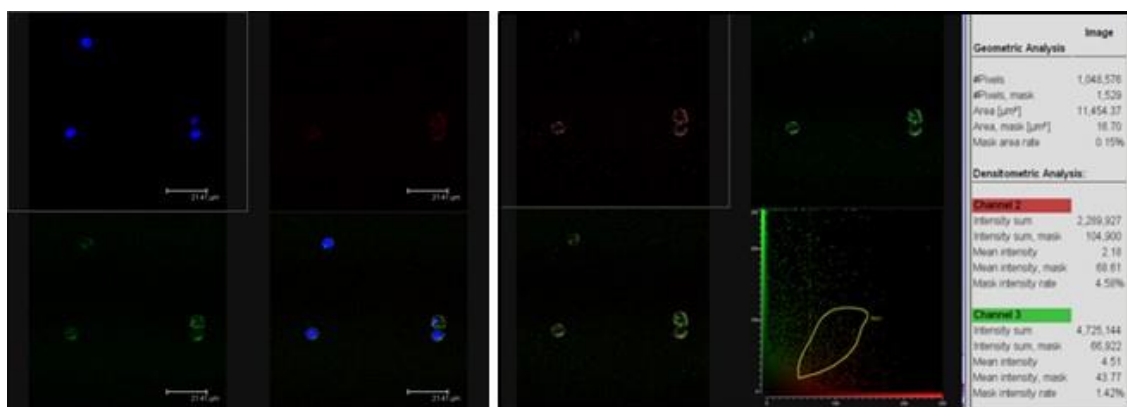
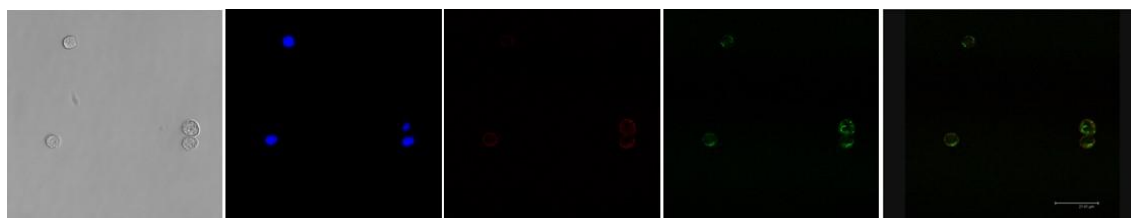
Los resultados del análisis de expresión de CXCR4 mediante microscopía confocal mostraron un aumento de intensidad de fluorescencia en las muestras tratadas con VEGF-165, existiendo una co-localización de CXCR4 y Flotilin (Figura 4.34 A y B). Se observó una acumulación de dicha molécula en la membrana celular, sugiriendo una posible ubicación en los *lipid raft*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se realizó la extracción de proteínas de membrana para poder obtener resultados más concluyentes. En esta fracción proteica, se observó un aumento de intensidad de fluorescencia de Phospho-Lyn y una acumulación en la membrana cuando las células fueron tratadas con VEGF-165. La activación de la fosforilación se muestra en la figura 4.34 C. En este estudio se utilizaron células de la línea celular Mec-1, células B de pacientes LLC-B y células B normales de individuos sanos.

A)



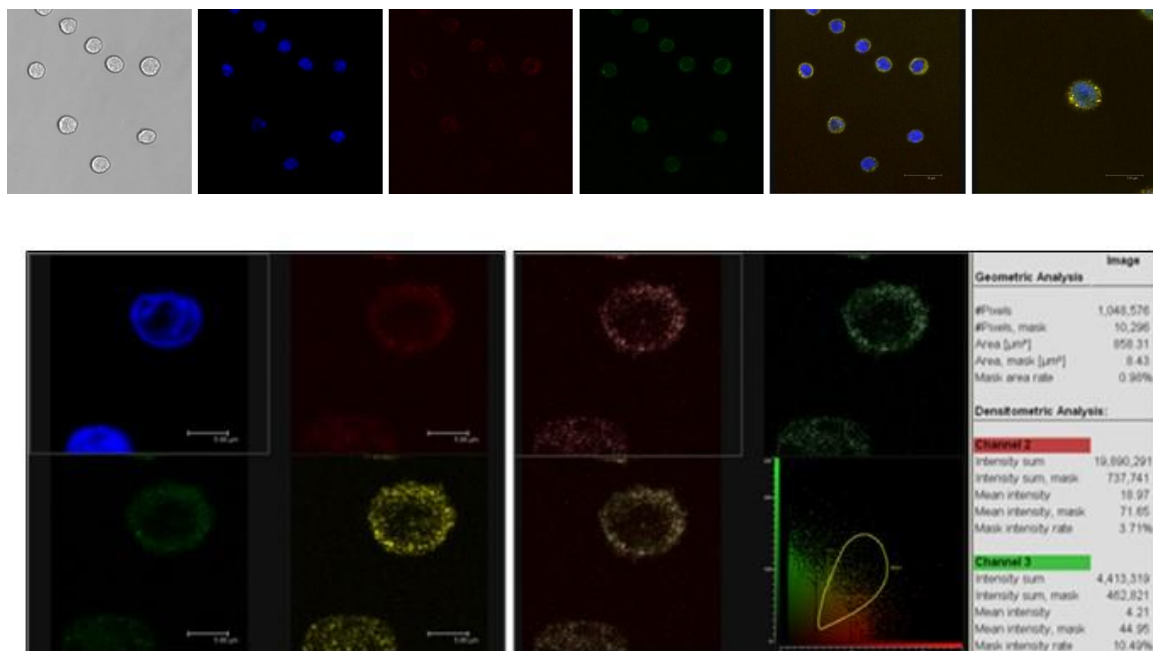
B)

Mec-1 control:



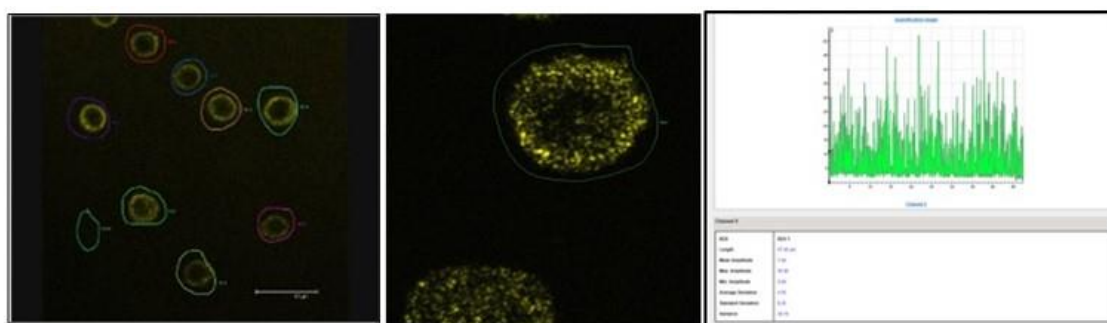
IMF CXCR4 (rojo) y Lyn (verde)

Células de Mec-1 tratadas con VEGF-165 24 horas:



IMF de CXCR4 (rojo), Lyn (verde) y co-localización (amarillo) en células de Mec-1 tratadas con VEGF-165 24 horas

C)



IMF de P-LYN (amarillo) en células de Mec-1 tratadas con VEGF-165 24h

Figura 4.34 Análisis de la intensidad de expresión de CXCR4 y co-localización de CXCR4-Lyn en *lipids-raft* de células Mec-1 mediante microscopia confocal. A) IMF de CXCR4 en células control de Mec-1 y células tratadas con VEGF-165 (50ng/ml)

durante 24 horas, **B**) co-localización de CXCR4 (alexa fluor 647) y Lyn (fluoresceína) en células control y en células tratadas con VEGF (50ng/ml) durante 24 horas, **C**) Phospho-Lyn tras tratamiento con VEGF-165 (50ng/ml). Se sembraron 3×10^6 de células de la línea celular Mec-1. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (azul).

3.5 Correlación de resultados con las características clínicas y biológicas de los pacientes.

Los ensayos realizados con células primarias de pacientes mostraron una heterogeneidad en la expresión de CXCR4 y en el grado de la migración potencialmente relacionada con las características clínicas y biológicas del paciente. Así, se observó una tendencia (p -valor <0.09) a una mayor migración cuando los pacientes presentan marcadores biológicos adversos (ZAP-70 y CD38 positivos) (Figura 4.35). Así, la migración celular que presentaban las células leucémicas B tratadas con VEGF-165 a diferentes tiempos (24h, 48h y 72 horas), mostró una relación positiva con la expresión CD38 (p -valor=0,067).

Respecto a los niveles de expresión de CXCR4, también se observó una heterogeneidad en el grado de incremento de la expresión, desde 0,43 IMF en formas no progresivas hasta 2,17 IMF en los pacientes con enfermedad progresiva, por lo que la IMF fue mayor en aquellos pacientes que presentaban un peor pronóstico de enfermedad.

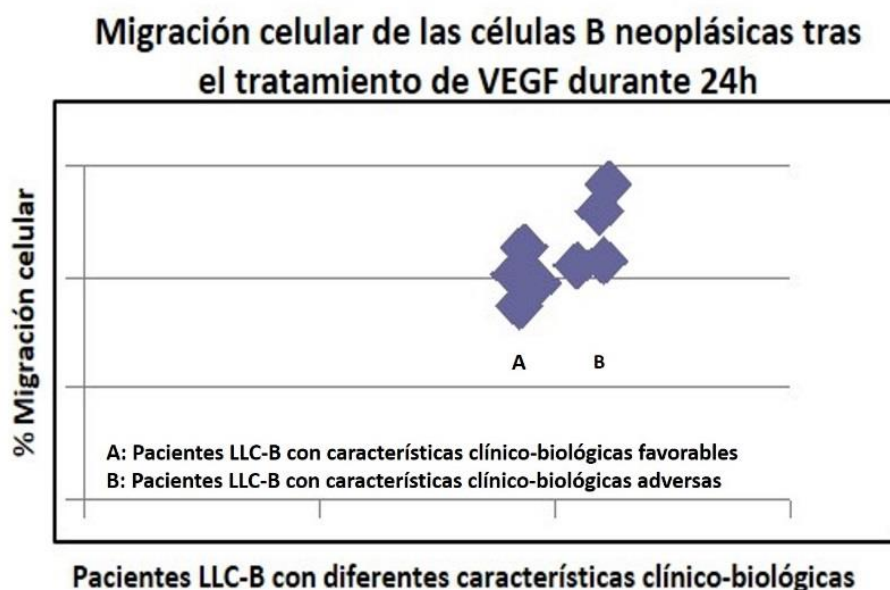


Figura 4.35 Variabilidad de migración celular entre células B de pacientes LLC-B con diferentes características clínicas a las 24h de tratamiento con VEGF-165. Las células B de pacientes con características clínicas de peor pronóstico presentaron una mayor migración celular. Datos normalizados de cada paciente con su control en ausencia de tratamiento.

Finalmente, se observó una correlación positiva significativa entre las variables cuantitativas IMF de CXCR4, CCR7 y CD49d con la expresión CD38 (p-valor=0,034, 0,07 y 0,006, respectivamente) y con el estadio de enfermedad (clasificación Rai) de los pacientes LLC-B estudiados (p-valor=0,03, 0,031 y 0,041, respectivamente).

Tanto para la línea celular Mec-1 como para las células B neoplásicas de los pacientes empleados los resultados fueron similares, comportándose Mec-1 como un paciente en estadio avanzado de enfermedad. Los resultados obtenidos podrían permitir mejorar a la identificación de grupos de pacientes con diferente capacidad de respuesta al VEGF. Por ello, los resultados sugieren la posible utilización de VEGF y de CXCR4 como potenciales dianas terapéuticas en estos pacientes.

4. Estudio de los polimorfismos genéticos del VEGF, VEGF-R1, bFGF y su implicación clínica

Debido a que VEGF y bFGF juegan un papel importante en el proceso angiogénico y se encuentran sobreexpresados en varios tipos de cánceres, en el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de los polimorfismos que influyen en la expresión de estos genes. Los SNPs de VEGF, VEGF-R1 y bFGF seleccionados, fueron analizados para determinar si la presencia de las variantes alélicas mostraba asociación con la susceptibilidad y las características clínicas de la LLC-B.

4.1 SNPs y riesgo a la enfermedad LLC-B

Los SNPs estudiados fueron seleccionados a través de bioinformática y revisión bibliográfica. Se seleccionaron cuatro polimorfismos 3'UTR en el gen *VEGF*, un polimorfismo en la región promotora del gen *VEGF-R1* y un polimorfismo en la región cds-Synon del gen *bFGF*. Se analizaron un total de 6 SNPs individuales cuyas características se muestran en la tabla 4.12.

Gen	Cr	Posición Cr	Ref SNP	Sustitución	Alelo minoritario	Localización	Ensayo Taqman
VEGF	6	43860514	rs3025039	C/T	T	3'UTR	C_16198794_10
VEGF	6	43837733	rs1109324	G/T	T	Promotor	C_8311589_10
VEGF	6	43838622	rs1547651	A/T	T	Promotor	C_8311590_10
VEGF	6	43831313	rs833052	A/C	A	Promotor	C_8311590_10
VEGF-R1	13	-	rs111458691	C/T	T	Promotor	C_27837581_10
bFGF	4	123967536	rs1449683	C/T	T	Cds-syn	C_8837641_10

Cr, cromosoma

Tabla 4.12 Características de los SNPs estudiados de los genes *VEGF*, *VEGF-R1* y *bFGF*.

El análisis del genotipo de los cuatro SNPs del gen *VEGF*: rs1109324, rs1547651, rs3025039 [936 (C/T)] y rs833052, un polimorfismo localizado en el promotor de VEGF-R1 rs111458691, y del polimorfismo rs1449683 en el gen *bFGF*, fue realizado en 230 pacientes LLC-B con diferentes características clínicas y hematológicas con una mediana de edad de 67 años, y en 476 donantes sanos utilizados como grupo control con una mediana de edad de 44 años. El análisis del genotipo se realizó mediante discriminación alélica con sondas Taqman por PCR cuantitativa.

La distribución de los SNPs candidatos se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) con un p-valor > 0,05. Las frecuencias genotípicas ajustadas por edad y sexo no mostraron diferencias entre ambos grupos de estudio.

Las posiciones de los SNPs fueron nombradas en relación a las secuencias de referencia VEGFA: NM_001171630.1, VEGF-R1: NM_002019.4 y bFGF: NM_002006.4. Las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs estudiadas en nuestro grupo de pacientes y en el grupo control, así como el riesgo a padecer la enfermedad, se resume en la tabla 4.13.

Polimorfismos	Mejor modelo ¹	Genotipo	Controles (n=476)	Casos (n=230)	OR (95%IC) ^a	p-valor
rs3025039 VEGF		C/C	355 (75.4%)	188 (83.9%)		
	D	C/T-T/T	116 (24.6%)	36 (16.1%)	0.59 (0.39-0.89)	0.0092 *
rs1109324 VEGF		G/G	334 (70.9%)	162 (75.3%)		
	A	G/T	127 (29.1%)	51 (23.7%)	0.79 (0.56-1.10)	0.16
		T/T	10 (2.1%)	2 (0.9%)		
rs1547651 VEGF	A	A/A	325 (68.7%)	173 (75.2%)	1.35 (0.98-1.88)	0.066
		A/T	138 (29.2%)	54 (23.5%)		
		T/T	10 (2.1%)	3 (1.3%)		
rs833052 VEGF	O	C/C-A/A	330 (72%)	141 (77.9%)	0.73 (0.49-1.10)	0.13
		C/A	128 (27.9%)	40 (22.1%)		
rs1449683 bFGF		C/C	374 (90.1%)	175 (85%)		
	D	C/T-T/T	41 (9.9%)	31 (15.1%)	1.62 (0.98-2.66)	0.063
rs111458691 VEGF-R1		C/C	451 (94.8%)	220 (96.9%)		
	D	C/T-T/T	25 (5.2%)	7 (3.1%)	0.57 (0.24-1.35)	0.18

^a Odds ratio (OR) e intervalo de confianza del 95% (IC) para el principal efecto del SNP

¹ El Criterio de Información de Akaike (AIC) y el Criterio de Información Bayesiano (BIC) se calcularon para seleccionar el mejor modelo de herencia para cada polimorfismo específico. El modelo preferido es aquel con el menor valor AIC y BIC. Abreviaturas: A, modelo Log-aditivo; O, sobredominante; D, dominante. Nivel de significación estadística *p<0,005.

Tabla 4.13 Frecuencias genotípicas y alélicas de VEGF, VEGF-R1 y bFGF. Riesgo a la enfermedad LLC-B: valores de Odds ratio (OR) y p-valor.

Los resultados demostraron que las frecuencias de los genotipos del SNP rs3025039 del VEGF fueron diferentes entre el grupo de pacientes y el grupo control. La combinación de los heterocigotos +936 C/T y homocigotos T/T, tuvo una menor

frecuencia en pacientes (16,1%) respecto del grupo control (24,6%). Por tanto, en nuestro estudio, la presencia de una T en el genotipo de este polimorfismo (variante heterocigota C/T u homocigota T/T), se asoció a un menor riesgo de padecer la enfermedad, es decir, se observó un efecto protector significativo del SNP rs3025039 para la LLC-B (p -valor=0,0092; OR=0,59 (95% IC: 0,39-0,89)).

Además, en el análisis de asociación entre los polimorfismos y la predisposición a desarrollar LLC-B, se observó que la presencia del SNP rs1449683 del gen *bFGF* se asociaba a una predisposición a desarrollar LLC-B que no llegó a alcanzar la significación estadística (p =0.06). Los resultados mostraron una mayor frecuencia del alelo T en los pacientes LLC-B respecto al grupo control. Por otro lado, la presencia de una T en la posición 223 del gen *bFGF* se asoció a una predisposición a la enfermedad 1,62 veces mayor que en otros genotipos (p -valor=0,063; OR= 1,62 (95% IC: 0,98-2,66)). Nuestros datos sugieren que la sustitución de una C por una T en el SNP rs1449683 del gen *bFGF* podría contribuir a la susceptibilidad y a la progresión de la enfermedad.

4.2 Análisis de haplotipos del gen *VEGF* y riesgo a la enfermedad LLC-B

Realizamos un análisis de haplotipos para evaluar el impacto clínico de los cuatro SNPs de *VEGF* estudiados, que se localizan en el mismo gen. En la figura 4.36 se muestran los 5 haplotipos identificados con las frecuencias estimadas, el OR y el p -valor obtenido mediante el programa SNPstats. La frecuencia de los haplotipos TGAC, CTTC, CGAA de los SNPs rs3025039, rs1109324, rs1547651 y rs833052 se asoció con la protección al desarrollo de la enfermedad (OR=0.49, 95% IC (0.31-0.79) p -valor=0.0036; OR 0.17 (0.08-0.36) p -valor<0.0001; OR 0.21 (0.10-0.41) p -valor<0.001, respectivamente). El test global para la combinación de los haplotipos estimados mostró un p -valor<0,0001.

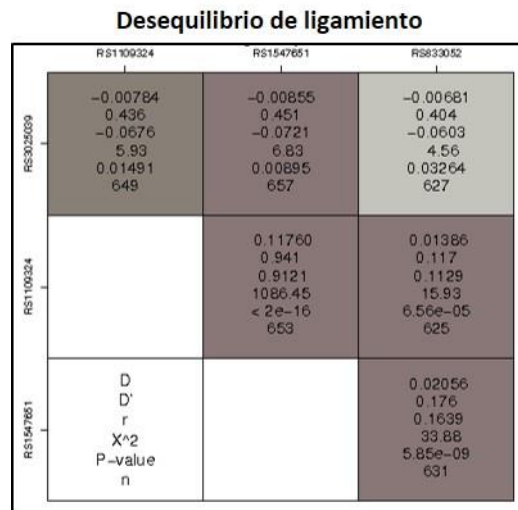
Por su parte, los valores del desequilibrio de ligamiento (LD) obtenidos con el programa SNPstats, mostraron una fuerte asociación entre los SNPs rs1109324 y rs1547651 (D' =0,094; p -valor<0,0001).

A)

	rs3025039	rs1109324	rs1547651	rs833052	Frecuencias	OR (95% IC)	p-valor
Haplotipo 1	C	G	A	C	0,635	1	-
Haplotipo 2	T	G	A	C	0,106	0,49 (0,31-0,79)	0,0036
Haplotipo 3	C	T	T	C	0,094	0,17 (0,08-0,36)	<0,0001
Haplotipo 4	C	G	A	A	0,0895	0,21 (0,10-0,41)	<0,0001
Haplotipo 5	C	T	T	A	0,0354	1,93 (0,092-4,02)	0,082

Asociación haplotipo global; p-valor<0,0001***

B)



Estadístico D'	rs3025039	rs1109324	rs1547651	rs833052
rs3025039	.	0.436	0.451	0.404
rs1109324	.	.	0.941	0.117
rs1547651	.	.	.	0.176
rs833052

Figura 4.36 Análisis multiple-SNP rs3025039, rs1109324, rs1547651 y rs833052. A) Análisis de haplotipos de *VEGF* en el ADN genómico de sangre periférica de todos los participantes de este estudio. Se muestran las frecuencias esperadas, OR y p-valor de los haplotipos. **B)** Desequilibrio de ligamiento (LD). El valor D' mostró una elevada dependencia entre los SNPs rs1109324 y rs1547651 (mayor intensidad de color gris).

Globalmente, los SNPs del *VEGF* estudiados (rs3025039, rs1109324, rs1547651 y rs833052) y la combinación de los haplotipos TGAC, CTTC y CGAA mostraron un efecto protector frente al desarrollo de la enfermedad.

4.3 Asociación de los haplotipos del *VEGF* con la supervivencia

El estudio de la asociación entre el haplotipo más frecuente CGAC +/- comprendido por las posiciones rs3025039, rs1109324, rs1547651 y rs833052 del *VEGF* de los pacientes estudiados y la supervivencia global (SG), mostró una menor supervivencia de los pacientes con dicho genotipo respecto a los pacientes con otros genotipos (HR=3,44; p-valor=0,064). La figura 4.37 muestra que los pacientes con genotipo CGAC +/- presentan una mayor mortalidad que los pacientes con otros genotipos.

Este efecto fue especialmente llamativo en el subgrupo de pacientes con positividad para CD38 y ZAP-70, alcanzando diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos. (Figura 4.38). Nuestro grupo de estudio con dicho haplotipo, presentó un riesgo 2,25 veces mayor que los que no lo presentaban.

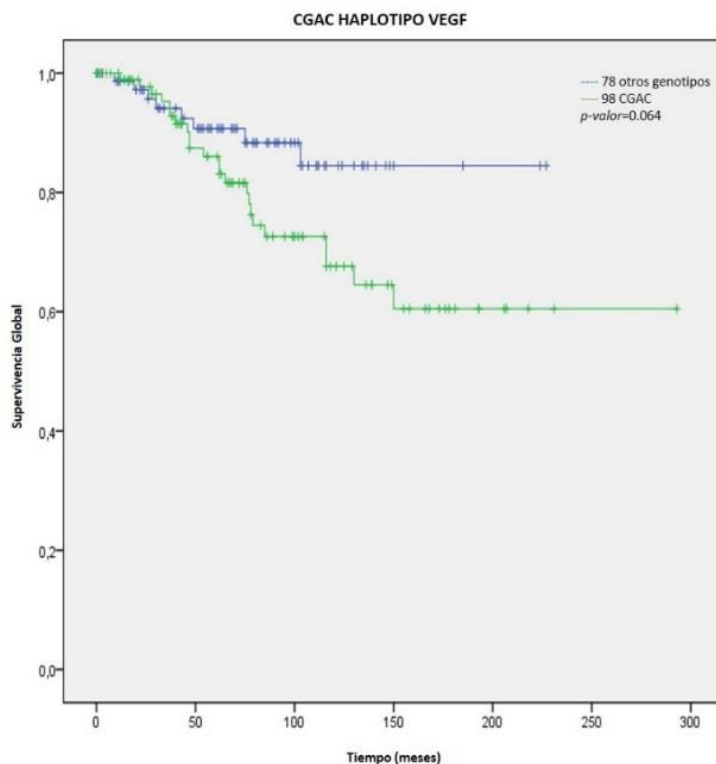
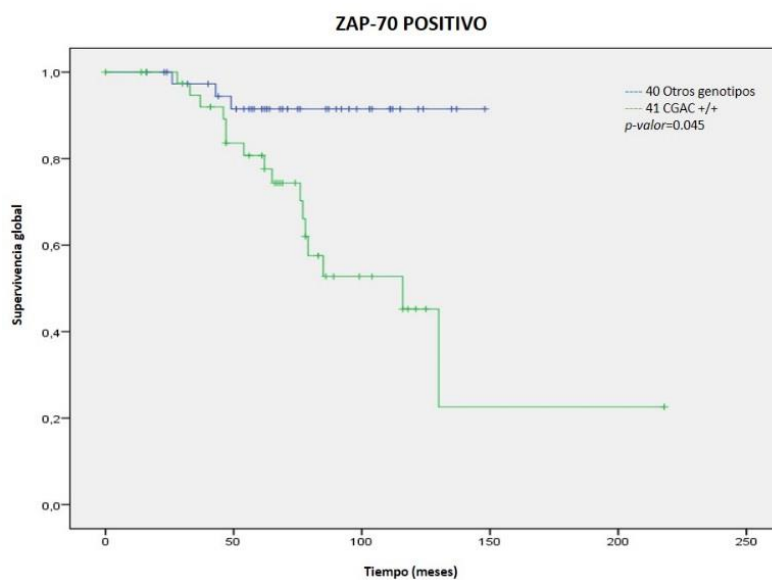


Figura 4.37 Asociación del genotipo VEGF rs3025039/rs1109324/1547651/rs833052 CGAC +/+ y SG de pacientes LLC-B. Curvas Kaplan- Maier respecto el haplotipo CGAC +/+ VEGF y otros genotipos. Los pacientes con genotipo CGAC +/+ (n=98) presentan una mayor mortalidad que los pacientes con otros genotipos (n=78) (tendencia estadística; p-valor=0,064).

A)



B)

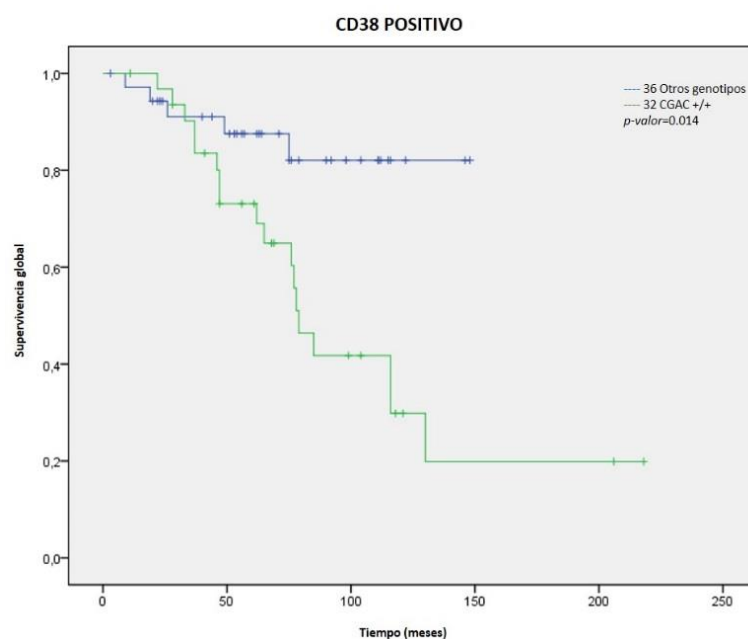


Figura 4.38 Curvas Kaplan-Meier respecto al haplotipo más frecuente de VEGF CGAC +/+ (posiciones rs3025039/rs1109324/1547651/rs833052) frente a otros

genotipos en pacientes LLC-B **A)** expresión Zap-70 positiva (p-valor=0,045) y **B)** expresión CD38 positiva (p-valor=0,014).

4.4 Correlación de los SNPs en el *VEGF*, *VEGF-R1* y *bFGF* con los factores clínico-patológicos de los pacientes LLC-B. Impacto pronóstico de los SNPs estudiados en la supervivencia

Para investigar la posible influencia biológica de los SNPs de *VEGF*, *VEGF-R1* y *bFGF* sobre la enfermedad, se correlacionaron los genotipos obtenidos con las principales características biológicas y clínicas de nuestro grupo de pacientes. Los resultados estadísticamente significativos, se muestran en la tabla 4.14.

IV. Resultados

Variante	Genotipo	Variable	OR (95% IC)	p-valor
rs302503	C/T-T/T	Nivel Hb ^a	3.91(0.51-7.30)	0.02
rs1449683	C/T-T/T	Riesgo genético	4.46 (1.31-15.23)	0.025
rs1547651	A/A			
	A/T	Nivel Hb ^a	4.90 (2.24-7.57)	4,00E-04
	T/T			
rs1547651	A/A	Adenopatías ^a	0.44 (0.21-0.92)	0.021
	A/T			
	T/T			
rs1547651	A/A	Estado Binet	0.13 (0.02-0.97)	0.0059
	A/T			
	T/T			
rs1547651	A/A	Estado Rai	0.38 (0.18-0.79)	0.0058
	A/T			
	T/T			
rs1547651	A/A	Riesgo genético	0.16 (0.02-1.22)	0.02
	A/T			
	T/T			
rs1109324	G/G	Riesgo genético	0.16 (0.02-1.21)	0.021
	G/T			
	T/T			

Abreviaturas: ^aMedia al diagnóstico, OR: odds ratio; IC, intervalo de confianza.

Tabla 4.14 Asociación de los genotipos de VEGF y bFGF en pacientes LLC-B con factores de riesgo significativos. Se muestran solo los resultados estadísticamente significativos.

Los resultados mostraron una asociación del SNP rs3025039 del *VEGF* con la presencia de elevados niveles de hemoglobina en sangre en el momento del diagnóstico en nuestro grupo de pacientes (p-valor= 0,019). No se observó ninguna otra asociación estadísticamente significativa para el SNP3025039 936 (C>T) del *VEGF* y las diferentes covariables estudiadas.

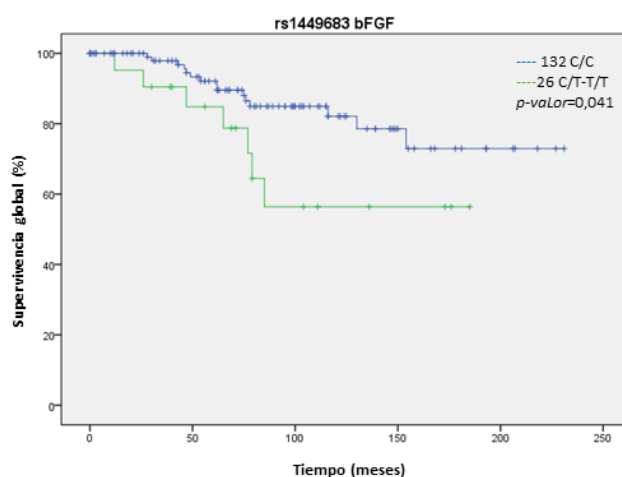
El SNP rs1109324 de *VEGF* se asoció con el riesgo citogenético (p-valor=0,021) y específicamente con la del13q (p-valor=0,039), marcador conocido de buen pronóstico. Así mismo, el SNP rs154765 del *VEGF* se correlacionó con el estado de enfermedad Rai y Binet (p-valor=0,0096 y 0,0063, respectivamente), con el riesgo citogenético (p-valor=0,021), con la presencia de adenopatías (p-valor=0,038) y con los valores de hemoglobina al diagnóstico (p-valor<0,001). En todos ellos, la presencia de una T en los mismos, se asoció a una menor incidencia de estadios avanzados, alteraciones citogenéticas adversas y presencia de adenopatías.

Respecto a *bFGF*, el análisis mostró una asociación significativa de la variante genotípica T/- del SNP rs1449683 con el riesgo citogenético elevado (p-valor=0,025; OR=4,46 (1,31-15,23). Además, se observó una correlación de este SNP con el riesgo citogenético de los pacientes estratificando a los pacientes en dos grupos según las anomalías citogenéticas que presentaban (coeficiente de correlación de Pearson=0,01).

Para finalizar, evaluamos si los resultados obtenidos del estudio genotípico de nuestro grupo de pacientes con diferentes estadios de enfermedad, lesiones genéticas y principales características moleculares, podrían tener un impacto en la supervivencia. El análisis univariado para el genotipo de los pacientes con la presencia del alelo minoritario T del SNP rs 1449683 del gen *bFGF* se correlacionó con la SG, mostrando una menor SG que otros genotipos (p-valor=0,023). Además, los análisis de supervivencia presentaron diferencias estadísticamente significativas para este SNP en pacientes con estadios tempranos de enfermedad (estadio A de Binet), mostrando una peor SG que los pacientes que presentaban estadios más avanzados (p-valor=0,024), así como un menor tiempo de tratamiento (TTP) (p-valor=0,004).

Las curvas de Kaplan-Meier del genotipo bFGF (T/-) rs1449683 y la SG, se muestran en la figura 4.39.

A)



B)

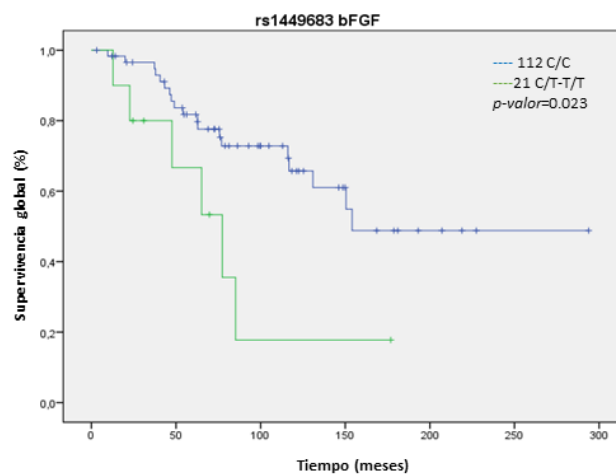


Figura 4.39 Asociación del genotipo rs1449683 bFGF y la SG en nuestro grupo de pacientes LLC-B. Curvas de Kaplan Meier respecto al genotipo bFGF (T/-) frente otros genotipos (C/C). **A)** SG en el grupo global de pacientes LLC-B (Log Rank Mantel-Cox p-valor=0,041), **B)** SG en pacientes LLC-B con estadio A de Binet (p-valor=0,024)

V. DISCUSIÓN

La LLC-B es un síndrome linfoproliferativo maligno heterogéneo caracterizado por la acumulación lenta y progresiva de linfocitos B monoclonales funcionalmente incompetentes como consecuencia de la recepción de señales de proliferación y de supervivencia celular procedentes de su microambiente (54, 239). A pesar de los avances en el conocimiento biológico de la enfermedad y en las opciones terapéuticas, continúa siendo una enfermedad incurable. Su principal característica es su marcada heterogeneidad, con un 40-50% de pacientes que presentan marcadores pronóstico adversos (expresión de ZAP-70, alteraciones citogenéticas de riesgo y ausencia de mutaciones en la región variable de IgVH) que suelen asociarse a un curso clínico agresivo, con desarrollo progresivo de quimio-resistencia y muerte por progresión de la enfermedad. El 50-60% restante, suelen presentar marcadores pronóstico más favorables (mutaciones en IgVH, alteraciones citogenéticas de buen pronóstico) y suelen asociarse a un curso más indolente, mayor supervivencia y una mayor duración de la respuesta a los tratamientos. Hasta el momento, se desconoce la causa de su variabilidad clínica y pronóstica (54, 240, 241), pero los avances en el conocimiento de la biología de la enfermedad apuntan a un distinto origen celular y a una notable influencia del microentorno celular. Se piensa que las propias células leucémicas y las moléculas presentes en su entorno contribuyen al desarrollo y mantenimiento de la proliferación linfocitaria leucémica (121, 242). Por ello, en la presente tesis nos hemos centrado en la influencia de una de las facetas del microambiente celular, la angiogénesis en la progresión de la enfermedad.

En la actualidad, los factores pronósticos están relacionados con al menos 4 elementos fundamentales: las características del paciente (edad avanzada y sexo masculino se relacionan con factores adversos), la magnitud de la masa neoplásica (estadios clínicos avanzados, patrón histológico de infiltración medular difusa, niveles séricos elevados de LDH y β 2-microglobulina se consideran factores de mal pronóstico), la biología del clon leucémico (ausencia de mutaciones en IgVH, tiempo de duplicación linfocitario <12 meses, anomalías citogenéticas, moleculares o del inmunofenotipo) y el grado de respuesta al tratamiento) (8, 9, 20, 21, 67, 222, 243).

En nuestro estudio se incluyeron 230 pacientes con una mediana de edad de 67 años (rango 33-93). La mediana de edad refleja la tendencia actual en torno a 65-70 años, similar a la mayoría de estudios de LLC-B (216, 217). En coherencia con lo descrito en la literatura, en nuestra serie, existe un ligero predominio masculino (60%) (7, 244).

Los estadios clínicos de Rai y Binet son los sistemas vigentes para clasificar a los pacientes con LLC-B y se basan en la extensión de las adenopatías, esplenomegalia y hepatomegalia y la presencia de anemia y/o trombopenia (12, 13). A pesar del reconocido impacto pronóstico de los mismos, estas clasificaciones no permiten distinguir la evolución más agresiva de los pacientes que se encuentran en un mismo estadio, sobre todo en los estadios iniciales. Las series más recientes muestran que una amplia mayoría de pacientes se diagnostican en fases iniciales de la enfermedad (245, 246), tal y como ocurre en nuestra cohorte, donde el 87% de ellos se encuentra en estadio A de Binet y un 63% pertenece al estado 0 de Rai. Dada esta limitación, es necesario identificar otros parámetros clínicos y biológicos que nos permitan individualizar mejor el pronóstico dentro de los estadios iniciales (8, 247).

Uno de los principales factores pronóstico ligados a la biología de la enfermedad reproducido en la mayoría de las series, ha sido la ausencia o presencia de mutaciones en IgVH (38, 39). Dada la complejidad técnica de su determinación, se propusieron una serie de variables sustitutorias que permitieran aproximarse a dicho parámetro, como la expresión de CD38 y ZAP-70. Aunque la concordancia no es del 100%, dichos marcadores han mostrado un pronóstico relevante en numerosas series (24, 248). En nuestro trabajo, el estudio mutacional estaba disponible en un número muy limitado de pacientes, lo cual impidió su análisis. No obstante, de acuerdo con lo conocido en la literatura, tanto la expresión de CD38 (38, 249, 250) como de ZAP-70 (27, 28) se asocia a un intervalo más corto de tiempo al primer tratamiento y a una menor supervivencia, confirmando el impacto pronóstico comunicado en otras series.

También la presencia de alteraciones citogenéticas de alto riesgo, como la presencia de del11q o del17p identifican pacientes de elevado riesgo. En concordancia con lo

comunicado, también los pacientes de nuestra serie con dicho marcadores se asocian a un peor pronóstico. Finalmente, los niveles séricos de β_2 -microglobulina se asocian a una peor calidad de la respuesta y a una peor supervivencia en numerosas series (24, 52). De nuevo en nuestra experiencia, la β_2 -microglobulina emerge como un factor pronóstico con valor independiente para la SG y el TTP. Por todo ello concluimos que nuestra serie de pacientes es representativa de la enfermedad que centra el presente trabajo, ya que sus datos son concordantes con las características generales de una población de LLC-B (47, 48, 251-253).

1. Estudio de expresión de membrana y expresión intracitoplasmática de los receptores de VEGF y MMP-9 y la expresión génica de VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y bFGF. Correlación de resultados con las principales características clínicas y biológicas de los pacientes LLC-B.

Con el objetivo de conocer los mecanismos que regulan la progresión de la LLC-B, estudiamos el VEGF, sus receptores y las implicaciones biológicas de la vía en esta enfermedad (254, 255). Nuestros resultados confirman que las células B neoplásicas presentan niveles más elevados de VEGF-R1, VEGF-R2 y VEGF-R3 que los linfocitos B no neoplásicos. Ello refleja, lo previamente comunicado en la literatura (255-257).

Además, encontramos asociación significativa entre los niveles de expresión de superficie de los tres receptores de VEGF y algunos factores clínicos y biológicos adversos de los pacientes con LLC-B. Concretamente, hemos detectado que la elevada expresión de los tres receptores se relaciona con la expresión de la proteína ZAP-70 y el antígeno CD38. La expresión de VEGF-R1 y VEGF-R2 se encuentra asociada al estadio avanzado de enfermedad en los pacientes LLC-B estudiados y VEGF-R1 con la presencia de adenopatías. Como sabemos, en la LLC-B tanto la expresión de CD38 como de ZAP-70, están asociadas a una mayor agresividad de la enfermedad (28, 176, 258, 259). Adicionalmente pudimos comprobar que los pacientes en estadios avanzados presentan

una media de expresión superior a los pacientes en estadios iniciales, no obstante dicha diferencia no alcanza significación estadística, probablemente debido al limitado tamaño muestral. Otra limitación adicional puede haber sido los fenómenos de regulación con la consiguiente internalización del receptor. Todo ello apoya de manera indirecta la implicación de dicha vía en la progresión de la enfermedad.

Por otra parte, hemos comprobado que la expresión intracitoplasmática de VEGF y MMP-9 es más elevada en células B leucémicas que en linfocitos B normales. Además, los niveles de expresión de MMP-9 y VEGF en nuestra serie de pacientes, mostraron una relación significativa con la presencia de adenopatías de más de 5 cm, la expresión CD38 y la co-expresión de ZAP-70/CD38 simultáneamente. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que argumentan que la producción de MMP-9 por las células de la LLC-B tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, puesto que los niveles altos en suero o intracelulares pueden relacionarse con estados avanzados de enfermedad y por tanto, con un pronóstico adverso (201, 206, 260, 261) (262). Adicionalmente, en nuestro grupo de pacientes, hallamos una asociación entre la presencia de elevados niveles de expresión de MMP-9 y un elevado riesgo citogenético. Estos resultados amplían el conocimiento sobre los mecanismos de progresión ligados a la enfermedad.

En el presente trabajo, hemos constatado que los mRNA de VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3 y bFGF presentan una sobreexpresión en pacientes con LLC respecto a linfocitos B de donantes sanos. Así, los análisis realizados mediante RTqPCR mostraron una relación positiva de la expresión génica de los receptores VEGF-R2 y VEGF-R3 con la expresión ZAP-70 en los pacientes LLC-B y una mayor expresión de VEGF-R3 en pacientes positivos para ZAP-70 y CD38. Asimismo, la expresión de VEGFR1 se asocia a un menor intervalo de tiempo al primer tratamiento. Estos resultados sugieren que los análisis de expresión de los receptores del VEGF podrían ser utilizados como marcadores de progresión de enfermedad, puesto que los niveles más elevados se asocian a una mayor agresividad de la enfermedad. Su impacto real necesitaría ser validado en una serie más amplia de pacientes.

El factor proangiogénico bFGF, está implicado en la migración celular y el proceso angiogénico (7, 263, 264). Estudios previos de otros grupos de investigación, han observado que los pacientes con LLC-B presentaban niveles séricos elevados de bFGF, existiendo una correlación de los niveles presentes en el suero de los pacientes con el estadio avanzado de la enfermedad (185). En nuestra experiencia los mRNA de bFGF en las formas progresivas de la LLC-B son superiores a las formas estables. Adicionalmente, de nuevo encontramos asociación entre los niveles de expresión de bFGF con la positividad de ZAP-70 y CD38 y la presencia de adenopatías. Sin embargo, otros estudios más recientes, no han encontrado asociación significativa de la expresión génica de bFGF detectada mediante RT-qPCR con factores pronósticos adversos en la LLC (265). No obstante, puesto que existe una cierta controversia, sería conveniente confirmar los resultados obtenidos ampliando el número de pacientes en el estudio.

Finalmente, los resultados obtenidos en la determinación de los niveles séricos de VEGF en pacientes LLC-B mediante ensayos de ELISA, mostraron concentraciones muy heterogéneas, con una media de 222 pg/ml, sin que se aprecien diferencias respecto al sexo o edad al diagnóstico, tal y como ha sido descrito en trabajos previos (266) (208). Diversos grupos de investigación observaron una correlación positiva entre la concentración sérica de VEGF y el estadio avanzado de la enfermedad, según la clasificación de Rai (185). Sin embargo, nuestro estudio no pone de manifiesto una asociación significativa, lo cual podría ser debido al limitado tamaño muestral. En este sentido, sería conveniente ampliar nuestra cohorte con objeto de extraer resultados concluyentes al respecto.

2. Estudio del papel de la vía VEGF/VEGF-R en la apoptosis y la migración celular en la LLC-B y su correlación con la expresión de CXCR4, CCR7 y CD49d. Correlación de resultados con las principales características clínicas y biológicas de los pacientes LLC-B

En sintonía con lo expuesto en la literatura, hemos comprobado que VEGF aumenta la supervivencia celular y la migración de los linfocitos B leucémicos. Por el contrario, ambas se ven significativamente reducidas en presencia del inhibidor del receptor 2 de VEGF Tyrphostin SU1498, lo que sugiere que VEGF-R2 está fuertemente implicado en ambos procesos. Con respecto al aumento de la supervivencia celular, la adición de VEGF a las muestras tratadas previamente con este inhibidor permitió recuperar la viabilidad, lo que hace pensar que en el proceso también participan otros receptores como VEGF-R1 y VEGF-R3. Cuando VEGF-R2 se encuentra bloqueado, los receptores 1 y 3 pueden jugar un papel adicional en la supervivencia celular, quizás debido a la diferente afinidad de los receptores a su ligando (VEGF). Estudios en tumores sólidos, han relacionado la sobreexpresión de VEGFR-3 con la formación y desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, jugando un papel muy importante en la motilidad celular y capacidad invasiva del tumor (193).

Así, los resultados son reproducibles en las células B de pacientes tanto con enfermedad inicial como avanzada. Sin embargo, al realizar los mismos ensayos con linfocitos B de individuos sanos, tan sólo observamos un leve incremento de viabilidad celular tras el tratamiento con VEGF, siendo esta diferencia de supervivencia celular notablemente menor que en los pacientes de nuestra serie y que en la línea celular Mec-1. Estos resultados demuestran que VEGF presenta un mayor efecto antiapoptótico en los linfocitos de la LLC que en los linfocitos B normales. Los datos obtenidos convierten a la vía VEGF/VEGF-R en una interesante fuente de dianas terapéuticas.

Los estudios *in vitro* del efecto sobre la apoptosis celular tras la administración de VEGF y diferentes inhibidores de MAPKs, apoyan a la ruta PI3K/Akt, en primer lugar, y a la ruta JNK, en segundo término, como las vías más implicadas en el proceso de supervivencia celular (267). Es bien conocido que ambas vías están constitutivamente activadas en los pacientes con LLC-B, y permiten vislumbrar la complejidad biológica de la enfermedad.

Además del estudio de la supervivencia celular mediada por VEGF, nuestro trabajo de investigación se ha centrado fundamentalmente en la migración celular. Ambos procesos resultan de gran relevancia en la progresión de esta enfermedad. Nuestros resultados apuntan que la activación de los receptores de VEGF mediante la estimulación con el ligando, sobre todo en el caso de VEGF-R2, ejerce un efecto migratorio y antiapoptótico de las células tumorales en la LLC-B. Estos resultados aparentemente contradicen los presentados en otros estudios realizados en LLC-B (268), en los cuales la administración de VEGF exógeno a concentraciones de 200 ngr/mL, superiores a las habitualmente producidas por los linfocitos B neoplásicos produce una reducción evidente en la migración celular y una reducción en la producción de MMP-9. En nuestro trabajo, se empleó VEGF exógeno a concentraciones de 50 ng/mL, concentración claramente inferior a la utilizada por Ugarte-Berzal E y cols (268). Tal y como los propios autores sugieren, es posible que el efecto de VEGF sobre la capacidad migratoria de la célula tumoral sea dosis-dependiente o varíe en función de los receptores angiogénicos potencialmente implicados. En este sentido hay que destacar, que en los centros de proliferación de los tejidos, sí existen elevados niveles de VEGF producido fundamentalmente por las células del estroma (200). Dicha concentración podría favorecer la retención del linfocito en dicho compartimento con la finalidad de interactuar activamente con su microentorno. Por el contrario, en sangre periférica donde dichas concentraciones son claramente inferiores, VEGF podría favorecer la supervivencia celular y la re-circulación desde el torrente sanguíneo a los tejidos.

La exposición a VEGF se asocia a un aumento significativo en la intensidad media de fluorescencia de CXCR4, tanto por citometría de flujo como por técnicas de microscopia confocal. Sin embargo, no se aprecia variación en la expresión de CCR7. No obstante, la aplicación del inhibidor del receptor 2 provoca una disminución de la intensidad de expresión de CXCR4, CCR7 y CD49d y del porcentaje de células que las expresan, recuperando dicha expresión con la re-administración de VEGF. Estos datos sugieren un potente papel regulador de la vía/VEGF-R2 en la expresión de estas quimiocinas.

A su vez, nuestros resultados apoyan que el papel de VEGF en la migración del linfocito B tumoral esta mediado, al menos en parte, por la regulación de la vía CXCR4/CXCL-12 .

El receptor de quimiocina CXCR4 que está heterogénea e intensamente expresado en la LLC-B, hace prolongar la supervivencia celular y participa en mecanismos de circulación y *homing* de los linfocitos B neoplásicos, favoreciendo la circulación en la sangre periférica y entrada en tejidos linfoides secundarios (up-regulación) y al mismo tiempo favoreciendo la retención en la MO (down-regulación) (129). En nuestro estudio pudimos comprobar el marcado grado de heterogenidad de la expresión de este receptor, con una tendencia a una sobreexpresión en estadios avanzados de la enfermedad y en las formas progresivas, en concordancia con lo previamente comunicado en la literatura (269).

El incremento observado en el índice de migración de las células B neoplásicas tratadas con VEGF exógeno respecto a las células sin estimular y la inhibición de la migración bloqueando a VEGF-R2, así como la restauración de la movilidad celular al adicionar VEGF a las células tratadas con inhibidor, nos confirma que la ruta VEGF/VEGF-R regula la migración transendotelial en la LLC-B. El hecho de que la adición de VEGF induzca una recuperación del efecto apoya la potencial implicación de otros receptores en dicho proceso (VEGFR-1 o VEGFR-3). La heterogeneidad obtenida respecto el grado de incremento de la migración de los linfocitos B neoplásicos podría relacionarse con la biología de la enfermedad, ya que hemos observado una mayor migración celular en pacientes LLC-B que presentan marcadores biológicos adversos, concretamente ZAP-70 y CD38.

Nuestros resultados son coherentes con estudios recientes que han confirmado que los factores proangiogénicos VEGF y FGF hacen responder a las células endoteliales frente quimiocinas hematológicas (como CXCL12), induciendo una regulación de la expresión de los receptores de quimiocinas respectivos (como CXCR4). Estos cambios de expresión están envueltos en procesos de migración y/o adhesión, ya que se ha

observado la existencia de una reducción significativa del desarrollo vascular (formación del túbulo vascular) mediante un antagonista de CXCR4 (AMD3100) (270). Asimismo, el eje CXCR4/CXCL12 presenta un importante papel en la metastatización tumoral en otros modelos (271-273). Diversos autores han plasmado la importancia de esta vía, y así la transfección de células B con el RNA de ZAP-70 se traduce en un aumento de expresión de CXCR4 y un aumento de migración celular (28).

Debido a que las señales que inducen migración celular de los linfocitos se basan fundamentalmente en la activación por quimiocinas (121), hemos estudiado la expresión de CXCR4, CCR7 y CD49d para profundizar en el conocimiento de este proceso implicado en la evolución de la LLC-B.

Hemos observado, así mismo una elevada variabilidad de expresión basal de CXCR4, CCR7 y CD49d en pacientes LLC-B. La expresión diferencial se encuentra fuertemente relacionada con la evolución de la LLC-B, con una mayor expresión de las mismas en las formas progresivas de la enfermedad. Adicionalmente, hemos observado una relación significativa entre la IMF de CXCR4, CCR7 y CD49d con la expresión de CD38 y con el estadio de enfermedad (clasificación de Rai) de los pacientes LLC-B estudiados. Nuestros resultados son coherentes con los comunicados de manera reciente por diversos autores y reflejan la marcada heterogeneidad biológica y clínica de esta enfermedad (274).

El papel de VEGF en la supervivencia y migración celular de los linfocitos B tumorales inducidos a través de la regulación al alza del sistema CXCR4/CXCL12 es el resultado más concluyente de este trabajo de investigación.

Diversos autores han sugerido un posible papel de la metaloproteínasa-9 en la migración a través de la degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos durante la angiogénesis (275) así como su inducción por el efecto del CXCR4 y de la integrina CD49d (201) (204). Nuestros resultados apoyan dicha idea, puesto que hemos encontrado una relación entre el incremento de expresión de MMP-9 con las características adversas de los pacientes con LLC-B. Estas características de mal

pronóstico asociadas a la elevada expresión de MMP-9 son la masa bulky y la expresión CD38.

Por tanto, nuestros resultados están en consonancia con otros trabajos recientes que demuestran que la presencia de la proteína MMP-9 es la responsable de la degradación de la membrana basal vascular por mediación de la integrina $\alpha 4\beta 1$ que induce la formación de podosomas que es donde se localiza la proteína MMP-9. El bloqueo de MMP-9 mediante inhibidores específicos provoca la inhibición de la degradación (155). La correlación de la expresión de los receptores de VEGF y la MMP-9 con la expresión de CD38 estaría en consonancia con los datos aportados por algunos autores, en los que MMP-9 se co-localiza en los podosomas con CD38 y con CD44 participando activamente en la invasión y migración tumoral (153, 260).

Los resultados obtenidos podrían mejorar la identificación de grupos de pacientes con diferente capacidad de respuesta al VEGF, y al mismo tiempo sugieren el papel de VEGF y de CXCR4 como potenciales dianas terapéuticas en estos pacientes. Debido a que la expresión de CXCR4 y la migración celular en la línea celular Mec-1 y en células primarias de pacientes LLC-B es mayor que en linfocitos B normales de sujetos sanos y que el diferente patrón de expresión y migración tras el estímulo de la vía VEGF se relaciona con ciertas características adversas de los pacientes, sugerimos que el eje CXCR4/CXCL12 juega un papel muy relevante en la patogenia de LLC-B.

Los resultados obtenidos mediante técnicas de microscopia confocal nos muestran una mayor intensidad de fluorescencia de CXCR4 total y CXCR4 fosforilado tanto en la línea celular Mec-1 como en células primarias de pacientes LLC-B cuando son estimuladas con VEGF a diferentes tiempos de tratamiento. A tiempos cortos de exposición ya es posible obtener un incremento de intensidad de fluorescencia de CXCR4, que va aumentando progresivamente conforme se incrementa el tiempo de exposición con VEGF. Por el contrario, en los linfocitos B de individuos sanos, no se observa modificación de la intensidad de expresión de CXCR4 y P-CXCR4 tras el tratamiento con VEGF a diferentes tiempos de incubación. La detección de dicho efecto

de manera precoz podría sugerir un mecanismo de transactivación subyacente entre el VEGFR-2 y CXCR4, tal y como ha sido descrito ya para otros factores de crecimiento (276, 277).

En los análisis de expresión proteica realizados mediante Western Blot, también detectamos un aumento de los niveles de la proteína CXCR4 total y fosforilada tras el tratamiento de las células neoplásicas con VEGF-165. Este aumento no es muy acusado si lo comparamos con los resultados obtenidos por microscopía confocal y CMF. El menor incremento de expresión observado, podría ser debido a las diferencias metodológicas o bien a que existe una rápida distribución de CXCR4 en respuesta al VEGF, localizándose y acumulándose en la membrana celular, y una respuesta más tardía de síntesis proteica de CXCR4. Así mismo, hemos comprobado mediante microscopía confocal la co-localización y acumulación de CXCR4 y Lyn en *lipid raft* de la membrana celular, aumentando claramente la intensidad de fluorescencia cuando las células neoplásicas son tratadas con VEGF. Lyn es una proteína que se encuentra constitutivamente activa en células B leucémicas y que contribuye a la señalización inducida por BCR. (278). Estas observaciones podrían explicar el ligero aumento de expresión proteica de CXCR4 y la activación de su fosforilación. Estos datos nos hacen pensar que VEGF podría regular no solo la síntesis de CXCR4 (elevada IMF comprobado mediante CMF y microscopía confocal), sino también la localización de las quimiocinas en la membrana celular de los linfocitos B leucémicos, fundamentalmente de CXCR4.

La señalización inducida por VEGF y la sensibilidad a inhibidores específicos de sus receptores, nos ha permitido identificar la implicación de la ruta VEGF/VEGF-R en la supervivencia y migración celular de los linfocitos B neoplásicos de la LLC-B y como dicho efecto tiene lugar, al menos parcialmente a través de la regulación al alza de CXCR4. Ello identifica al eje CXCR4/CXCL12 como un eje clave en la migración y en la progresión de la LLC-B. Así, algunos ensayos clínicos con el inhibidor de CXCR4 plerixafor han mostrado actividad en LLC-B (279), y de hecho los nuevos inhibidores de quinasas, Ibrutinib e idelalisib son capaces de regular a la baja dicho sistema (280). Dicha heterogeneidad en la expresión de CXCR4 de otras moléculas como CD49d influye en el

pronóstico y en la respuesta a los nuevos inhibidores de quinasas, tal y como se ha comunicado recientemente por algunos autores (281).

Los diferentes patrones de migración que presentan las células en función de las características clínicas y moleculares de los pacientes LLC-B, nos da pie a hipotetizar que la migración de las células B parece ser muy dependiente de la expresión de CXCR4 y que este sistema regula activamente la migración de las células B neoplásicas durante la evolución de la enfermedad a nichos metastásicos u otros microambientes, induciendo señales intracelulares y promoviendo la supervivencia celular en la LLC-B.

Finalmente, como sabemos, las células estromales protegen a los linfocitos neoplásicos de la apoptosis (116), por lo que el microambiente tumoral en la LLC participa de manera activa en la etiopatogenia de la enfermedad. Por ello, su estudio es de gran ayuda en la identificación de nuevas dianas terapéuticas. A pesar de la supervivencia prolongada de las células B de la LLC *in vivo*, cuando son cultivadas *in vitro* hemos observado que experimentan generalmente apoptosis de manera espontánea. Esto sugiere que el entorno o conjunto de células que rodean a las tumorales *in vivo* proporciona el soporte necesario para prolongar la supervivencia de las células LLC-B (282). Los datos obtenidos de los diferentes ensayos de viabilidad de las células B en contacto con células estromales y dendríticas, apuntan a que la adhesión de las células LLC al estroma de la medula ósea también modula la supervivencia de las células de la LLC *in vitro* a través de una inhibición de la apoptosis, por lo que el microambiente tiene una gran implicación pronóstica. Estos datos apoyan estudios recientes realizados por otros grupos de investigación (242).

En los experimentos *in vitro* con diferentes sistemas de cultivo celular, se observa que el efecto del entorno o microambiente generado por el contacto celular de los linfocitos B neoplásicos en suspensión y la monocapa de células HK, mejora la viabilidad en las células primarias de los pacientes LLC-B respecto a las células neoplásicas aisladas con diferentes tiempos de exposición a VEGF. Los experimentos *in vitro* con ambos sistemas de cultivo celular muestran que las células estromales protegen a los linfocitos

neoplásicos de la apoptosis, ejerciendo el microambiente un efecto protector contra la apoptosis espontánea e inducida por fármacos multiquinasas en LLC-B. Estos resultados soportan la necesidad de utilización de dichos modelos de co-cultivo para evaluar la eficacia de los nuevos fármacos en los diferentes compartimentos tisulares.

3. Estudio de polimorfismos genéticos del VEGF, VEGF-R1, bFGF y su valor pronóstico en la LLC-B

VEGF es un factor importante para la angiogénesis que realiza su función a través de diversos mecanismos que han demostrado ser un paso clave el progreso y el pronóstico de diferentes tipos de tumores (283) (284). Determinadas modificaciones genéticas, tales como los SNPs, pueden contribuir a generar diferentes niveles de expresión proteica en pacientes y estar asociado a la progresión de la enfermedad (285). De hecho, numerosos polimorfismos están involucrados en los cambios de expresión, interacción, conformación y estabilidad de las proteínas de diferentes moléculas. Así, los polimorfismos del gen *VEGF* pueden influir en la susceptibilidad y gravedad del cáncer (266, 286-292).

Existe una variabilidad significativa en los niveles de expresión de VEGF y bFGF en muestras de LLC-B (292, 293), siendo siempre estos niveles mayores en pacientes que en sujetos sanos. Numerosas evidencias sugieren que los factores angiogénicos son relevantes en la LLC-B y en otras enfermedades hematológicas, aunque su papel exacto se desconoce por el momento (7). De hecho, el aumento de los niveles de VEGF y bFGF se han asociado a las características de malignidad de la LLC-B (185, 208, 265, 266, 294).

Por ello, los SNPs estudiados del *VEGF*, *VEGF-R1* y *bFGF*, han sido analizados para determinar si la presencia de las variantes alélicas se encuentran asociadas con la susceptibilidad y progresión de la LLC-B.

En nuestro estudio, el alelo 936 T en el SNP rs3025039 del gen *VEGF* se ha asociado significativamente con un menor riesgo de desarrollar LLC-B, puesto que presentan una menor frecuencia de este genotipo los pacientes que los controles. Estos resultados son concordantes con los estudios previos de este alelo 936 T y el efecto protector a desarrollar otros tipos de cáncer (294-296). Además, también se encuentra asociado significativamente con la presencia de elevados niveles de hemoglobina en sangre en el momento de diagnóstico, un factor de buen pronóstico en pacientes con LLC-B.

La variante genotípica T/- del SNP rs1449683 en el gen *bFGF*, por su parte muestra una asociación estadísticamente no significativa con una mayor susceptibilidad a desarrollar LLC-B. Sin embargo, el polimorfismo bFGF parece relevante en la LLC-B, puesto que el alelo con tendencia a desarrollar la enfermedad (alelo T), además de asociarse a presentar una predisposición a la enfermedad, parece contribuir a la progresión de los pacientes LLC-B, debido a que detectamos una asociación significativa de este SNP con el riesgo citogenético elevado de los pacientes. Además, los pacientes con LLC-B portadores del alelo T (genotipos C/T y T/T) muestran una reducción de la supervivencia, que es más pronunciada en los estadios clínicos iniciales (Binet A). Estos datos sugieren un papel de este polimorfismo en la iniciación LLC-B y en su progresión. Los mecanismos íntimos todavía no son bien conocidos, por lo cual se debería realizar una investigación adicional sobre la repercusión funcional de los polimorfismos en los niveles de expresión y/o funcionalidad de la proteína.

Al correlacionar las características clínicas y moleculares de los pacientes LLC-B de nuestro grupo con los otros SNPs del *VEGF*, se observó una asociación del genotipo A/A del polimorfismo rs1547651 con el estado de enfermedad (Rai y Binet), con el riesgo citogenético y con la presencia de adenopatías. Por el contrario, los portadores del alelo T en su genotipo, presentaban con valores de hemoglobina alta, marcador de buen pronóstico. El SNP rs1109324 del *VEGF*, se asocia con un bajo riesgo citogenético (p-valor=0,021) y específicamente con la del13q (p-valor=0,039), marcador conocido de buen pronóstico.

Así mismo, la combinación de varios SNPs puede presentar una mayor asociación con el riesgo enfermedad o mayor relevancia pronóstica que un único SNP. Por ello, se han analizado los diferentes haplotipos, resultado de la combinación de los cuatro polimorfismos de *VEGF*. La frecuencia de los tres haplotipos TGAC, CTTC, CGAA comprendidos por las posiciones correspondientes rs3025039, rs1109324, rs1547651 y rs833052 del gen *VEGF* se asociaron significativamente con un menor riesgo de desarrollar la LLC-B. Por su parte, el análisis de los SNPs en nuestra cohorte de pacientes reveló que el haplotipo más frecuente CGAC+/+ de *VEGF* confiere un efecto adverso en la supervivencia respecto a los pacientes con otros genotipos (HR=3,44; p-valor=0,064). Además, en los pacientes que presentan factores pronósticos adversos (estado de expresión positivo de CD38 y/o Zap-70), la presencia de este haplotipo es un factor aditivo de malignidad.

Por tanto, los SNPs de *VEGF* estudiados rs3025039, rs1109324, rs1547651 y rs833052 y la combinación de los haplotipos TGAC, CTTC y CGAA, demuestran presentar efecto protector frente al desarrollo de la enfermedad, por lo que el *VEGF* es un interesante marcador predictivo en la LLC-B, tal y como sucede en otros tipos de cáncer (294, 296).

Estos resultados ponen en evidencia una vez más la importancia de los SNPs en la LLC-B y cómo los genotipos específicos en los factores angiogénicos *VEGF* y *bFGF*, pueden ser relevantes en la predicción y en el pronóstico de la LLC-B. En conclusión, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los polimorfismos en *VEGF* y *bFGF* pueden tener importantes implicaciones en la LLC-B y reafirman la creencia de que el estudio de la vía *VEGF* puede resultar una herramienta potencial de interés en la progresión tumoral y abre nuevas opciones terapéuticas en esta entidad. No obstante, resulta necesario profundizar más en su conocimiento y validar estos resultados con estudios funcionales para determinar el potencial impacto clínico de estos hallazgos.

En conclusión los resultados de esta tesis doctoral sugieren que la vía VEGF/VEGF-R está implicada en la viabilidad de las células B neoplásicas a través de la inhibición de la apoptosis y que además interviene en la regulación de la migración celular en la LLC-B a través de una regulación al alza de la expresión de CXCR4 sobre los linfocitos neoplásicos y un incremento en su fosforilación. Este efecto presenta una marcada heterogeneidad interpaciente relacionada fundamentalmente con factores biológicos adversos de la enfermedad. Dicho efecto se objetiva de manera precoz y está mediado al menos parcialmente por una co-localización de la molécula en los *lipid raft* de la membrana celular.

Estos resultados confirman la compleja heterogeneidad biológica de la enfermedad, con una notable interconexión entre los diversos *pathways* de señalización. Ello abre la puerta a nuevas vías de investigación que esclarezcan la potencial conexión de la vía VEGF/VEGFR con la cascada de señalización BCR. También se hace necesario ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de transactivación de las diversas cascadas de señalización y sus repercusiones en la supervivencia celular y en la migración (297).

Adicionalmente, próximos trabajos podrían basarse en la realización de ensayos funcionales mediante el co-cultivo con células estromales reproduciendo *in vitro* el entorno celular que existe *in vivo* (119, 298) con el objetivo de poder esclarecer en profundidad las principales vías de señalización intracelulares, así como, conocer el contexto donde se localiza la célula neoplásica para poder emplear terapias dirigidas con un mayor efecto antitumoral y poder así frenar la progresión de la LLC-B.

Por su parte, los resultados obtenidos, nos llevan a pensar en futuros estudios con fines terapéuticos mediante el empleo de fármacos noveles basados en el bloqueo de los receptores de VEGF. La inhibición de la ruta VEGF/VEGF-R de forma específica, sería una buena diana a estudiar, debido a que los linfocitos B sanos no son sensibles a los efectos del VEGF respecto a la expresión de CXCR4 como lo son las células B leucémicas. Así, valatinib y pazopanib son nuevos inhibidores potentes de VEGFR-1 y VEGFR-2 capaces de disminuir la fosforilación de VEGFR de manera eficiente y

promover la apoptosis de los linfocitos B neoplásicos de la LLC-B con una mínima repercusión sobre los linfocitos B normales. Asimismo, Sorafenib es capaz de inducir apoptosis celular en LLC-B a través de una regulación a la baja de Mcl-1.

Debido a la variabilidad detectada en la expresión de CXCR4 en los pacientes con LLC-B, otra potencial vía de investigación sería el estudio de la regulación de la expresión de este receptor de quimiocinas por la presencia de determinados polimorfismos. Estudiar los posibles SNPs genéticos en el gen *CXCR4* que pudieran hacer cambiar en parte su expresión y consecuentemente modificar los dos procesos que son objeto de estudio de esta tesis doctoral, la supervivencia y la migración celular, sería de gran utilidad, puesto que ambos procesos confieren la capacidad invasiva de las células LLC-B siendo vitales para el desarrollo y progresión de la enfermedad (299-301)

VI. CONCLUSIONES

- 1) La expresión superficial de VEGF-R1, VEGF-R2 y VEGF-R3 e intracitoplasmática de VEGF y MMP-9 es superior en las células B tumorales de la LLC-B que en los linfocitos B normales. Dichos niveles de expresión elevados se encuentran relacionados con factores clínicos y biológicos adversos como la presencia de CD38 y ZAP-70.
- 2) La expresión génica de VEGF-R1, VEGF-R2 y VEGF-R3 determinada mediante RTqPCR es superior en células B tumorales que en linfocitos B normales y se asocia a un intervalo libre de tratamiento más corto. El incremento de mRNA de VEGF-R2 y VEGF-R3 se encuentra a su vez asociado principalmente a la expresión de la proteína Zap-70. La expresión de bFGF se correlaciona con la presencia de adenopatías y la expresión de CD38 y ZAP-70.
- 3) La estimulación de la vía VEGF/VEGF-R aumenta la viabilidad de los linfocitos B neoplásicos a través de una inhibición de la apoptosis en contraposición a los linfocitos B normales. En dicho efecto anti-apoptótico se encuentran implicados diversos receptores del VEGF.
- 4) La estimulación de la vía VEGF/VEGF-R incrementa la migración transendotelial de los linfocitos B neoplásicos a través de una regulación en los niveles de expresión de CXCR4. Este incremento es significativamente superior al observado en los linfocitos B normales.
- 5) La estimulación con VEGF exógeno induce un aumento en la expresión de CXCR4 y en la fosforilación del mismo. Asimismo, favorece la co-localización del CXCR4 en los *lipid raft*.
- 6) Los diferentes patrones de migración celular están relacionados con las características clínicas y biológicas de los pacientes LLC-B. El incremento de migración se relaciona con la presencia de marcadores biológicos adversos, como la expresión de Zap-70, CD38, y el estadio avanzado de enfermedad.
- 7) La estimulación de la vía VEGF/VEGFR interviene en la regulación de la expresión de otras quimiocinas como CXCR4, CCR7 y CD49d. Esta implicación es particularmente relevante en la regulación de los niveles de expresión de CXCR4.

- 8) El genotipo T/- del SNP rs3025039 de *VEGF* presenta un efecto protector frente al desarrollo de la LLC-B, y por tanto, se encuentra asociado significativamente a un menor riesgo de padecer la enfermedad. La presencia de una T en el SNP rs1449683 del gen *bFGF* se asocia con una tendencia a una predisposición a la enfermedad y se correlaciona con una menor supervivencia, siendo más acusada en pacientes LLC-B con estadios tempranos de enfermedad (estado A de Binet).
- 9) Los SNPs del *VEGF* estudiados rs3025039, rs1109324, rs1547651 y rs833052 y sus haplotipos TGAC, CTTC y CGAA muestran un efecto protector frente al desarrollo de la enfermedad.
- 10) El haplotipo más frecuente en los pacientes LLC-B estudiados CGAC +/- comprendido por las posiciones correspondientes de los SNPs rs3025039, rs1109324, rs1547651 y rs833052 del gen *VEGF*, se asocia a una menor supervivencia global respecto los pacientes que presentan otros genotipos. Dicho haplotipo confiere un efecto adverso adicional en la supervivencia de los pacientes LLC-B con expresión positiva de ZAP-70 y CD38.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Caligaris-Cappio F, Schena M, Gottardi D, Gaidano G, Gregoretti MG, Ghia P, et al. Cellular and molecular mechanisms conditioning the accumulation of resting neoplastic cells in B-lymphocyte chronic lymphatic leukemia]. *Haematologica*. 1991 Jun;76 Suppl 3:93-9.
2. Howlader N, Noone AM, Yu M, Cronin KA. Use of imputed population-based cancer registry data as a method of accounting for missing information: application to estrogen receptor status for breast cancer. *Am J Epidemiol*. 2012 Aug 15;176(4):347-56.
3. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3724-34.
4. Howlader N, Ries LA, Mariotto AB, Reichman ME, Ruhl J, Cronin KA. Improved estimates of cancer-specific survival rates from population-based data. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Oct 20;102(20):1584-98.
5. Dighiero G. Biology of the neoplastic lymphocyte in B-CLL. *Baillieres Clin Haematol*. 1993 Dec;6(4):807-20.
6. Finch SC, Linet MS. Chronic leukaemias. *Baillieres Clin Haematol*. 1992 Jan;5(1):27-56.
7. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC, Howell KH, Geyer SM, Dewald GW, et al. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia*. 2002 May;16(5):911-9.
8. Chiorazzi N, Allen SL, Ferrarini M. Clinical and laboratory parameters that define clinically relevant B-CLL subgroups. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;294:109-33.
9. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1995 Oct 19;333(16):1052-7.
10. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, 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 Jun 15;111(12):5446-56.
11. Sabattini E, Bacci F, Sagramoso C, Pileri SA. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica*. 2010 Jun;102(3):83-7.
12. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975 Aug;46(2):219-34.
13. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981 Jul 1;48(1):198-206.
14. Chronic lymphocytic leukaemia: proposals for a revised prognostic staging system. Report from the International Workshop on CLL. *Br J Haematol*. 1981 Jul;48(3):365-7.

15. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood*. 1999 Jul 15;94(2):448-54.
16. Goede V, Cramer P, Busch R, Bergmann M, Stauch M, Hopfinger G, et al. Interactions between comorbidity and treatment of chronic lymphocytic leukemia: results of German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group trials. *Haematologica*. 2014 Jun;99(6):1095-100.
17. Geisler CH, Hou-Jensen K, Jensen OM, Tinggaard-Pedersen N, Hansen MM, Hansen NE, et al. The bone-marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is not an important prognostic factor. Danish CLL Study Group. *Eur J Haematol*. 1996 Oct;57(4):292-300.
18. Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, et al. Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood*. 1984 Sep;64(3):642-8.
19. Montserrat E, Villamor N, Reverter JC, Brugues RM, Tassies D, Bosch F, et al. Bone marrow assessment in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: aspirate or biopsy? A comparative study in 258 patients. *Br J Haematol*. 1996 Apr;93(1):111-6.
20. Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol*. 1986 Mar;62(3):567-75.
21. Schroers R, Griesinger F, Trumper L, Haase D, Kulle B, Klein-Hitpass L, et al. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2005 May;19(5):750-8.
22. Durig J, Naschar M, Schmucker U, Renzing-Kohler K, Holter T, Huttmann A, et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2002 Jan;16(1):30-5.
23. Bosch F, Abrisqueta P, Villamor N, Terol MJ, Gonzalez-Barca E, Ferra C, et al. Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone: a new, highly active chemoimmunotherapy regimen for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 20;27(27):4578-84.
24. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, Bergmann MA, Elter T, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 Jul 3;124(1):49-62.
25. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Mar 1;93(5):1732-7.
26. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001 Dec 3;194(11):1639-47.
27. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated

immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4944-51.

28. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003 May 1;348(18):1764-75.

29. Ferrero E, Malavasi F. Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal cell antigen 1 and aplysian ADP-ribosyl cyclase. *J Immunol*. 1997 Oct 15;159(8):3858-65.

30. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Durig J, Morabito F, Duhrsen U, et al. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2003 Sep 15;102(6):2146-55.

31. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):1023-9.

32. Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, Robillard N, Ifrah N, Mahe B, et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2002 Jan;116(1):142-50.

33. Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest*. 1991 Jan;87(1):1-5.

34. de la Fuente MT, Casanova B, Moyano JV, Garcia-Gila M, Sanz L, Garcia-Marco J, et al. Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J Leukoc Biol*. 2002 Mar;71(3):495-502.

35. Till KJ, Spiller DG, Harris RJ, Chen H, Zuzel M, Cawley JC. CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood*. 2005 Jun 15;105(12):4813-9.

36. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nuckel H, et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2014 Mar 20;32(9):897-904.

37. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998 Oct 15;102(8):1515-25.

38. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1840-7.

39. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1848-54.

40. Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Aug 15;100(4):1410-6.
41. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003 Feb 1;101(3):1087-93.
42. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C, et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood*. 2004 Jan 15;103(2):375-82.
43. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Oct 20;118(16):4313-20.
44. Krober A, Bloehdorn J, Hafner S, Buhler A, Seiler T, Kienle D, 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 Feb 20;24(6):969-75.
45. Oscier DG, Stevens J, Hamblin TJ, Pickering RM, Lambert R, Fitchett M. Correlation of chromosome abnormalities with laboratory features and clinical course in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1990 Nov;76(3):352-8.
46. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med*. 1990 Sep 13;323(11):720-4.
47. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000 Dec 28;343(26):1910-6.
48. Porpaczy E, Bilban M, Heinze G, Gruber M, Vanura K, Schwarzingner I, et al. Gene expression signature of chronic lymphocytic leukaemia with Trisomy 12. *Eur J Clin Invest*. 2009 Jul;39(7):568-75.
49. Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997 Apr 1;89(7):2516-22.
50. Faguet GB. Chronic lymphocytic leukemia: an updated review. *J Clin Oncol*. 1994 Sep;12(9):1974-90.
51. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol*. 1996 Feb;92(2):382-8.
52. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Dohner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014 May 22;123(21):3247-54.

53. Farooqui MZ, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with Tp53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.* 2015 Feb;16(2):169-76.
54. Rodriguez-Vicente AE, Diaz MG, Hernandez-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogenous disease. *Cancer Genet.* 2013 Mar;206(3):49-62.
55. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2011 Jul 7;475(7354):101-5.
56. Lobry C, Oh P, Mansour MR, Look AT, Aifantis I. Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. *Blood.* 2014 Apr 17;123(16):2451-9.
57. Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Bea S, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia.* 2013 Apr;27(5):1100-6.
58. Arruga F, Gizdic B, Serra S, Vaisitti T, Ciardullo C, Coscia M, et al. Functional impact of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2014 May;28(5):1060-70.
59. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2011 Dec 29;365(26):2497-506.
60. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood.* 2011 Dec 22;118(26):6904-8.
61. Martinez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A, Aymerich M, Jares P, Juan M, et al. Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood.* 2014 Jun 12;123(24):3790-6.
62. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in Tp53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012 Mar 22;119(12):2854-62.
63. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell.* 2013 Feb 14;152(4):714-26.
64. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of Tp53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2015 Apr;29(4):877-85.
65. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst.* 1999 May 19;91(10):861-8.
66. Hillmen P, Robak T, Janssens A, Babu KG, Kloczko J, Grosicki S, et al. Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic

lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet*. 2015 May 9;385(9980):1873-83.

67. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. 2013 Sep;88(9):803-16.

68. Leporrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, et al. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood*. 2001 Oct 15;98(8):2319-25.

69. Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, Liberati A, Loscertales J, Herbrecht R, et al. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 10;27(26):4378-84.

70. Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJ, Bezares RF, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007 Jul 21;370(9583):230-9.

71. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):885-91.

72. Flinn IW, Neuberg DS, Grever MR, Dewald GW, Bennett JM, Paietta EM, et al. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J Clin Oncol*. 2007 Mar 1;25(7):793-8.

73. Bosch F, Ferrer A, Lopez-Guillermo A, Gine E, Bellosillo B, Villamor N, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2002 Dec;119(4):976-84.

74. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2635-42.

75. Fiegl M, Stauder R, Steurer M, Mian M, Hopfinger G, Brychtova Y, et al. Alemtuzumab in chronic lymphocytic leukemia: final results of a large observational multicenter study in mostly pretreated patients. *Ann Hematol*. 2014 Feb;93(2):267-77.

76. Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, Jaksic B, Dmoszynska A, Wu J, et al. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2007 Dec 10;25(35):5616-23.

77. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A, et al. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1749-55.

78. Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010 Jun 3;115(22):4393-402.

79. Cartron G, de Guibert S, Dilhuydy MS, Morschhauser F, Leblond V, Dupuis J, et al. Obinutuzumab (GA101) in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: final data from the phase 1/2 GAUGUIN study. *Blood*. 2014 Oct 2;124(14):2196-202.
80. Tam CS, O'Brien S, Wierda W, Kantarjian H, Wen S, Do KA, et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):975-80.
81. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010 Oct 2;376(9747):1164-74.
82. Robak T, Dmoszynska A, Solal-Celigny P, Warzocha K, Loscertales J, Catalano J, et al. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1756-65.
83. Parikh SA, Keating MJ, O'Brien S, Wang X, Ferrajoli A, Faderl S, et al. Frontline chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, alemtuzumab, and rituximab for high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Aug 25;118(8):2062-8.
84. Reynolds C, Di Bella N, Lyons RM, Hyman W, Richards DA, Robbins GJ, et al. A Phase III trial of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab vs. pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Invest New Drugs*. 2012 Jun;30(3):1232-40.
85. Fischer K, Cramer P, Busch R, Stilgenbauer S, Bahlo J, Schweighofer CD, et al. Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2011 Sep 10;29(26):3559-66.
86. Fischer K, Cramer P, Busch R, Bottcher S, Bahlo J, Schubert J, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2012 Sep 10;30(26):3209-16.
87. Eichhorst B, FAM, Busch R., et al. . Front-line chemoimmunotherapy with fludarabine (F), cyclophosphamide (C) and rituximab (R) (FCR) shows superior efficacy in comparison to bendamustine (B) and rituximab (BR) in previously untreated and physically fit patients with advanced chronic lymphocytic leukemia (CLL): final analysis of an international, randomized study of the german CLL study group (GCLLSG)(CLL10 study). *Blood*. 2014;124:abstract 19.
88. Lepretre S, Aurran T, Mahe B, Cazin B, Tournilhac O, Maisonneuve H, et al. Excess mortality after treatment with fludarabine and cyclophosphamide in combination with alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized phase 3 trial. *Blood*. 2012 May 31;119(22):5104-10.
89. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014 Mar 20;370(12):1101-10.

90. Sharman J, Hawkins M, Kolibaba K, Boxer M, Klein L, Wu M, et al. An open-label phase 2 trial of entospletinib (GS-9973), a selective spleen tyrosine kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015 Apr 9;125(15):2336-43.
91. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, Lacasce A, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010 Apr 1;115(13):2578-85.
92. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2014 Jul 17;371(3):213-23.
93. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE, Sharman JP, Burger JA, Blum KA, et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Jan;15(1):48-58.
94. Burger JA, Keating MJ, Wierda WG, Hartmann E, Hoellenriegel J, Rosin NY, et al. Safety and activity of Ibrutinib plus rituximab for patients with high-risk chronic lymphocytic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2014 Sep;15(10):1090-9.
95. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014 Mar 13;370(11):997-1007.
96. Seymour JF, Davids M.S.n Pagel J.M., et al. ABT-199 (GDC -0199) in relapsed/refractory (R/R) Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) and small lymphocytic lymphoma (SLL): high complete response rate and durable disease control. . *J Clin Oncol*. 2014;32(abstract 7015).
97. Badoux XC, Keating MJ, Wen S, Wierda WG, O'Brien SM, Faderl S, et al. Phase II study of lenalidomide and rituximab as salvage therapy for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2013 Feb 10;31(5):584-91.
98. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011 Aug 25;365(8):725-33.
99. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*. 2012 Mar 22;119(12):2709-20.
100. Sutton L, Chevret S, Tournilhac O, Divine M, Leblond V, Corront B, et al. Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia: a multicenter, randomized, controlled trial from the SFGM-TC and GFLLC. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6109-19.
101. Michallet M, Dreger P, Sutton L, Brand R, Richards S, van Os M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: results of European intergroup randomized trial comparing autografting versus observation. *Blood*. 2011 Feb 3;117(5):1516-21.

102. Dreger P, Corradini P, Kimby E, Michallet M, Milligan D, Schetelig J, et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia*. 2007 Jan;21(1):12-7.
103. Kharfan-Dabaja MA, Pidala J, Kumar A, Terasawa T, Djulbegovic B. Comparing efficacy of reduced-toxicity allogeneic hematopoietic cell transplantation with conventional chemo-(immuno) therapy in patients with relapsed or refractory CLL: a Markov decision analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Sep;47(9):1164-70.
104. Bottcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch RM, Fingerle-Rowson G, et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 20;30(9):980-8.
105. Caligaris-Cappio F. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. *Blood*. 1996 Apr 1;87(7):2615-20.
106. Fischer M, Klein U, Kuppers R. Molecular single-cell analysis reveals that CD5-positive peripheral blood B cells in healthy humans are characterized by rearranged V κ genes lacking somatic mutation. *J Clin Invest*. 1997 Oct 1;100(7):1667-76.
107. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Durig J, et al. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2012 Nov 19;209(12):2183-98.
108. Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, Cullen M, Kennedy B, Richards SJ, et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2289-90.
109. Almeida J, Nieto WG, Teodosio C, Pedreira CE, Lopez A, Fernandez-Navarro P, et al. CLL-like B-lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults. *Leukemia*. 2011 Apr;25(4):718-22.
110. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011 Aug 16;20(2):246-59.
111. Alizadeh AA, Majeti R. Surprise! HSC are aberrant in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011 Aug 16;20(2):135-6.
112. Zhang S, Kipps TJ. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:103-18.
113. Fragoso R, Pereira T, Wu Y, Zhu Z, Cabecadas J, Dias S. VEGFR-1 (FLT-1) activation modulates acute lymphoblastic leukemia localization and survival within the bone marrow, determining the onset of extramedullary disease. *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1608-16.
114. Gine E, Martinez A, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Camos M, Martinez D, et al. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica*. 2010 Sep;95(9):1526-33.

115. Foroni L, Panayiotidis P, Hoffbrand AV. Lack of clonal BCRA2 gene deletion on chromosome 13 in chronic lymphocytic leukaemia: an update of recent scientific reports. *Br J Haematol.* 1998 Mar;100(4):800.
116. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood.* 1998 Apr 1;91(7):2387-96.
117. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol.* 1996 Jan;92(1):97-103.
118. Kawano Y, Kobune M, Yamaguchi M, Nakamura K, Ito Y, Sasaki K, et al. Ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells. *Blood.* 2003 Jan 15;101(2):532-40.
119. Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP, et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood.* 2009 Nov 12;114(20):4441-50.
120. Miyake K, Hasunuma Y, Yagita H, Kimoto M. Requirement for VLA-4 and VLA-5 integrins in lymphoma cells binding to and migration beneath stromal cells in culture. *J Cell Biol.* 1992 Nov;119(3):653-62.
121. Han TT, Fan L, Li JY, Xu W. Role of chemokines and their receptors in chronic lymphocytic leukemia: function in microenvironment and targeted therapy. *Cancer Biol Ther.* 2014 Jan;15(1):3-9.
122. Ferretti E, Bertolotto M, Deaglio S, Tripodo C, Ribatti D, Audrito V, et al. A novel role of the CX3CR1/CX3CL1 system in the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and tumor microenvironment. *Leukemia.* 2011 Aug;25(8):1268-77.
123. Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 28;103(48):18261-6.
124. Pontikoglou C, Kastrinaki MC, Klaus M, Kalpadakis C, Katonis P, Alpantaki K, et al. Study of the quantitative, functional, cytogenetic, and immunoregulatory properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Stem Cells Dev.* 2013 May 1;22(9):1329-41.
125. Lutzny G, Kocher T, Schmidt-Supprian M, Rudelius M, Klein-Hitpass L, Finch AJ, et al. Protein kinase c-beta-dependent activation of NF-kappaB in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell.* 2013 Jan 14;23(1):77-92.
126. Ding W, Knox TR, Tschumper RC, Wu W, Schwager SM, Boysen JC, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived

mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):2984-93.

127. Reinart N, Nguyen PH, Boucas J, Rosen N, Kvasnicka HM, Heukamp L, et al. Delayed development of chronic lymphocytic leukemia in the absence of macrophage migration inhibitory factor. *Blood*. 2013 Jan 31;121(5):812-21.

128. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2655-63.

129. Burger JA, Kipps TJ. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk Lymphoma*. 2002 Mar;43(3):461-6.

130. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, 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 Aug 1;106(3):1012-20.

131. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 2009 Oct 15;114(16):3367-75.

132. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Burkle A, Wierda WG, Keating MJ, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):3050-8.

133. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):563-74.

134. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):301-14.

135. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol*. 2004 Sep;5(9):943-52.

136. Burkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007 Nov 1;110(9):3316-25.

137. Burger JA. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol*. 2010 Dec;20(6):424-30.

138. 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 Dec 1;94(11):3658-67.

139. Mohle R, Failenschmid C, Bautz F, Kanz L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia*. 1999 Dec;13(12):1954-9.
140. Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV, Sivina M, Keating MJ, Wierda WG, 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 Jul 30;114(5):1029-37.
141. Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, Saint-Georges S, Chevallier N, Baran-Marszak F, et al. Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res*. 2009 Aug 15;69(16):6387-95.
142. Bennett F, Rawstron A, Plummer M, de Tute R, Moreton P, Jack A, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells show specific changes in membrane protein expression during different stages of cell cycle. *Br J Haematol*. 2007 Nov;139(4):600-4.
143. Calissano C, Damle RN, Hayes G, Murphy EJ, Hellerstein MK, Moreno C, et al. In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009 Nov 26;114(23):4832-42.
144. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4609-14.
145. Calpe E, Purroy N, Carpio C, Abrisqueta P, Carabia J, Palacio C, et al. ZAP-70 promotes the infiltration of malignant B-lymphocytes into the bone marrow by enhancing signaling and migration after CXCR4 stimulation. *PLoS One*. 2013;8(12):e81221.
146. Burger M, Hartmann T, Krome M, Rawluk J, Tamamura H, Fujii N, et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1824-30.
147. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):1761-7.
148. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):3603-12.
149. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, Wierda WG, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood*. 2012 Feb 2;119(5):1182-9.
150. Burger JA, Montserrat E. Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling. *Blood*. 2013 Feb 28;121(9):1501-9.

151. Sivina M, Hartmann E, Kipps TJ, Rassenti L, Krupnik D, Lerner S, et al. CCL3 (MIP-1alpha) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Feb 3;117(5):1662-9.
152. Yonekawa K, Harlan JM. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J Leukoc Biol*. 2005 Feb;77(2):129-40.
153. Zucchetto A, Vaisitti T, Benedetti D, Tissino E, Bertagnolo V, Rossi D, et al. The CD49d/CD29 complex is physically and functionally associated with CD38 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2012 Jun;26(6):1301-12.
154. Redondo-Munoz J, Escobar-Diaz E, Samaniego R, Terol MJ, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3143-51.
155. Redondo-Munoz J, Ugarte-Berzal E, Garcia-Marco JA, del Cerro MH, Van den Steen PE, Opendakker G, et al. Alpha4beta1 integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood*. 2008 Jul 1;112(1):169-78.
156. Till KJ, Lin K, Zuzel M, Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*. 2002 Apr 15;99(8):2977-84.
157. Brachtl G, Sahakyan K, Denk U, Girbl T, Alinger B, Hofbauer SW, et al. Differential bone marrow homing capacity of VLA-4 and CD38 high expressing chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One*. 2011;6(8):e23758.
158. Amigo-Jimenez I, Bailon E, Ugarte-Berzal E, Aguilera-Montilla N, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. Matrix metalloproteinase-9 is involved in chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine and arsenic trioxide. *PLoS One*. 2014;9(6):e99993.
159. de la Fuente MT, Casanova B, Cantero E, Hernandez del Cerro M, Garcia-Marco J, Silva A, et al. Involvement of p53 in alpha4beta1 integrin-mediated resistance of B-CLL cells to fludarabine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Nov 21;311(3):708-12.
160. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008 Jan 15;111(2):865-73.
161. Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND, Tschumper RC, Witzig TE, Nowakowski GS, et al. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol*. 2008 Mar;140(5):537-46.
162. Gu B, Dao LP, Wiley J. Impaired transendothelial migration of B-CLL lymphocytes: a defect linked to low L-selectin expression. *Leuk Lymphoma*. 2001 Jun;42(1-2):5-12.
163. Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:129-56.

164. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):499-511.
165. Muzio M, Scielzo C, Bertilaccio MT, Frenquelli M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2009 Feb;144(4):507-16.
166. Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Guyart A, Regnier A, Trudel S, Claisse JF, et al. TLR9 Ligand (CpG Oligodeoxynucleotide) Induces CLL B-Cells to Differentiate into CD20(+) Antibody-Secreting Cells. *Front Immunol*. 2014;5:292.
167. Tromp JM, Tonino SH, Elias JA, Jaspers A, Luijks DM, Kater AP, et al. Dichotomy in NF-kappaB signaling and chemoresistance in immunoglobulin variable heavy-chain-mutated versus unmutated CLL cells upon CD40/TLR9 triggering. *Oncogene*. 2010 Sep 9;29(36):5071-82.
168. Chatzouli M, Ntoufa S, Papakonstantinou N, Chartomatsidou E, Anagnostopoulos A, Kollia P, et al. Heterogeneous functional effects of concomitant B cell receptor and TLR stimulation in chronic lymphocytic leukemia with mutated versus unmutated Ig genes. *J Immunol*. 2014 May 15;192(10):4518-24.
169. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. 2000 Jan;67(1):2-17.
170. Bagnara D, Kaufman MS, Calissano C, Marsilio S, Patten PE, Simone R, et al. A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood*. 2011 May 19;117(20):5463-72.
171. Romano MF, Lamberti A, Tassone P, Alfinito F, Costantini S, Chiurazzi F, et al. Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine-induced apoptosis in B chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 1998 Aug 1;92(3):990-5.
172. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999 Sep;106(4):995-1004.
173. Spaargaren M, Beuling EA, Rurup ML, Meijer HP, Klok MD, Middendorp S, et al. The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLCgamma2. *J Exp Med*. 2003 Nov 17;198(10):1539-50.
174. Chen L, Huynh L, Apgar J, Tang L, Rassenti L, Weiss A, et al. ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2685-92.
175. Dühren-von Minden M, Ubelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*. 2012 Sep 13;489(7415):309-12.
176. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, 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 May 1;107(9):3584-92.

177. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*. 2012 Aug 9;120(6):1175-84.
178. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan XJ, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*. 2012 May 10;119(19):4467-75.
179. Chu CC, CATERA R, Hatzi K, Yan XJ, Zhang L, Wang XB, et al. Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):5122-9.
180. Stamatopoulos K. Antigens in CLL: themes and variations. *Blood*. 2010 May 13;115(19):3855-6.
181. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995 Jan;1(1):27-31.
182. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971 Nov 18;285(21):1182-6.
183. Bussolino F, Albini A, Camussi G, Presta M, Viglietto G, Ziche M, et al. Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur J Cancer*. 1996 Dec;32A(14):2401-12.
184. Peterson L, Kini AR. Angiogenesis is increased in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 Apr 15;97(8):2529.
185. Smolej L, Andrys C, Maisnar V, Pour L, Maly J. Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in lymphoproliferative disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2005;48(1):57-8.
186. List AF. Vascular endothelial growth factor signaling pathway as an emerging target in hematologic malignancies. *Oncologist*. 2001;6 Suppl 5:24-31.
187. Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis*. 2007 Sep-Oct;39(2):212-20.
188. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669-76.
189. Garvin S, Nilsson UW, Dabrosin C. Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells. *Br J Cancer*. 2005 Oct 31;93(9):1005-10.
190. Gershtein ES, Scherbakov AM, Anurova OA, Krasilnikov MA, Kushlinsky NE. Phosphorylated Akt1 in human breast cancer measured by direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay: Correlation with clinicopathological features and tumor VEGF-signaling system component levels. *Int J Biol Markers*. 2006 Jan-Mar;21(1):12-9.

191. Toi M, Bando H, Ogawa T, Muta M, Hornig C, Weich HA. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int J Cancer*. 2002 Mar 1;98(1):14-8.
192. Padro T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Steins M, Kienast J, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Apr 15;95(8):2637-44.
193. Su JL, Yen CJ, Chen PS, Chuang SE, Hong CC, Kuo IH, et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer*. 2007 Feb 26;96(4):541-5.
194. Frater JL, Kay NE, Goolsby CL, Crawford SE, Dewald GW, Peterson LC. Dysregulated angiogenesis in B-chronic lymphocytic leukemia: morphologic, immunohistochemical, and flow cytometric evidence. *Diagn Pathol*. 2008;3:16.
195. Chen H, Treweeke AT, West DC, Till KJ, Cawley JC, Zuzel M, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2000 Nov 1;96(9):3181-7.
196. Maffei R, Martinelli S, Castelli I, Santachiara R, Zucchini P, Fontana M, et al. Increased angiogenesis induced by chronic lymphocytic leukemia B cells is mediated by leukemia-derived Ang2 and VEGF. *Leuk Res*. 2010 Mar;34(3):312-21.
197. Lee YK, Bone ND, Strege AK, Shanafelt TD, Jelinek DF, Kay NE. VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2004 Aug 1;104(3):788-94.
198. Lee YK, Shanafelt TD, Bone ND, Strege AK, Jelinek DF, Kay NE. VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Leukemia*. 2005 Apr;19(4):513-23.
199. Pepper C, Ward R, Lin TT, Brennan P, Starczynski J, Musson M, et al. Highly purified CD38+ and CD38- sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin. *Leukemia*. 2007 Apr;21(4):687-96.
200. Gehrke I, Gandhirajan RK, Poll-Wolbeck SJ, Hallek M, Kreuzer KA. Bone marrow stromal cell-derived vascular endothelial growth factor (VEGF) rather than chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell-derived VEGF is essential for the apoptotic resistance of cultured CLL cells. *Mol Med*. 2011;17(7-8):619-27.
201. Kamiguti AS, Lee ES, Till KJ, Harris RJ, Glenn MA, Lin K, et al. The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2004 Apr;125(2):128-40.
202. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2005 Apr-Jun;9(2):267-85.
203. Bauvois B, Dumont J, Mathiot C, Kolb JP. Production of matrix metalloproteinase-9 in early stage B-CLL: suppression by interferons. *Leukemia*. 2002 May;16(5):791-8.

204. Ringshausen I, Dechow T, Schneller F, Weick K, Oelsner M, Peschel C, et al. Constitutive activation of the MAPkinase p38 is critical for MMP-9 production and survival of B-CLL cells on bone marrow stromal cells. *Leukemia*. 2004 Dec;18(12):1964-70.
205. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005 Oct-Dec;9(4):777-94.
206. Molica S, Vitelli G, Levato D, Giannarelli D, Vacca A, Cuneo A, et al. Increased serum levels of matrix metalloproteinase-9 predict clinical outcome of patients with early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol*. 2003 Jun;70(6):373-8.
207. Farahani M, Treweeke AT, Toh CH, Till KJ, Harris RJ, Cawley JC, et al. Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells. *Leukemia*. 2005 Apr;19(4):524-30.
208. Smolej L, Andrys C, Krejsek J, Belada DZ, Zak P, Siroky O, et al. [Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) are elevated in peripheral blood plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and decrease after intensive fludarabine-based treatment]. *Vnitr Lek*. 2007 Nov;53(11):1171-6.
209. Ferrajoli A, Manshouri T, Estrov Z, Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, et al. High levels of vascular endothelial growth factor receptor-2 correlate with shortened survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2001 Apr;7(4):795-9.
210. Przybylowska K, Kluczna A, Zadrozny M, Krawczyk T, Kulig A, Rykala J, et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2006 Jan;95(1):65-72.
211. Aguayo A, O'Brien S, Keating M, Manshouri T, Gidel C, Barlogie B, et al. Clinical relevance of intracellular vascular endothelial growth factor levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2000 Jul 15;96(2):768-70.
212. Menendez D, Krysiak O, Inga A, Krysiak B, Resnick MA, Schonfelder G. A SNP in the flt-1 promoter integrates the VEGF system into the p53 transcriptional network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 31;103(5):1406-11.
213. Menendez D, Inga A, Snipe J, Krysiak O, Schonfelder G, Resnick MA. A single-nucleotide polymorphism in a half-binding site creates p53 and estrogen receptor control of vascular endothelial growth factor receptor 1. *Mol Cell Biol*. 2007 Apr;27(7):2590-600.
214. Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004 Nov 24;119(5):591-602.
215. Schulz S, Kohler K, Schagdarsurengin U, Greiser P, Birkenmeier G, Muller-Werdan U, et al. The human FGF2 level is influenced by genetic predisposition. *Int J Cardiol*. 2005 May 25;101(2):265-71.
216. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. 1997 Oct;108(4):378-82.

217. Newman RA, Peterson B, Davey FR, Brabyn C, Collins H, Brunetto VL, et al. Phenotypic markers and BCL-1 gene rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 1993 Aug 15;82(4):1239-46.
218. Briggs C, Carter J, Lee SH, Sandhaus L, Simon-Lopez R, Vives Corrons JL. ICSH Guideline for worldwide point-of-care testing in haematology with special reference to the complete blood count. *Int J Lab Hematol*. 2008 Apr;30(2):105-16.
219. Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:31-50.
220. Witzig TE, Li CY, Tefferi A, Katzmann JA. Measurement of the intensity of cell surface antigen expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 1994 Mar;101(3):312-7.
221. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994 Oct;8(10):1640-5.
222. Matutes E, Attygalle A, Wotherspoon A, Catovsky D. Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Mar;23(1):3-20.
223. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971 Oct 30;2(7731):971-2.
224. Brothman AR, Persons DL, Shaffer LG. Nomenclature evolution: Changes in the ISCN from the 2005 to the 2009 edition. *Cytogenet Genome Res*. 2009;127(1):1-4.
225. Matthews C, Catherwood M, Morris TC, Alexander HD. Routine analysis of IgVH mutational status in CLL patients using BIOMED-2 standardized primers and protocols. *Leuk Lymphoma*. 2004 Sep;45(9):1899-904.
226. Kokhaei P, Palma M, Mellstedt H, Choudhury A. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol*. 2005;16 Suppl 2:ii113-23.
227. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfarano A, Circosta P, Gottardi D, et al. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in polyclonal transformation. *Leuk Res*. 1999 Feb;23(2):127-36.
228. Hoshi H, McKeehan WL. Brain- and liver cell-derived factors are required for growth of human endothelial cells in serum-free culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Oct;81(20):6413-7.
229. Soker S, Fidler IJ, Neufeld G, Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem*. 1996 Mar 8;271(10):5761-7.
230. Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Damaj G, Royer B, Gubler B, Marolleau JP. A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis in vitro. *PLoS One*. 2013;8(3):e60370.

231. Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol.* 2006;407:597-612.
232. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schutz G, et al. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer.* 2011 Jul 1;129(1):245-55.
233. Calpe E, Codony C, Baptista MJ, Abrisqueta P, Carpio C, Purroy N, et al. ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood.* 2011 Oct 20;118(16):4401-10.
234. Messmer D, Fecteau JF, O'Hayre M, Bharati IS, Handel TM, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia cells receive RAF-dependent survival signals in response to CXCL12 that are sensitive to inhibition by Sorafenib. *Blood.* 2011 Jan 20;117(3):882-9.
235. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):7099-109.
236. Hamilton E, Pearce L, Morgan L, Robinson S, Ware V, Brennan P, et al. Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2012 Sep;158(5):589-99.
237. George KS, Wu Q, Wu S. Effects of freezing and protein cross-linker on isolating membrane raft-associated proteins. *Biotechniques.* 2010 Nov;49(5):837-8.
238. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet.* 2004 Jan;74(1):106-20.
239. Vallespi T, Montserrat E, Sanz MA. Chronic lymphocytic leukaemia: prognostic value of lymphocyte morphological subtypes. A multivariate survival analysis in 146 patients. *Br J Haematol.* 1991 Apr;77(4):478-85.
240. Gruber M, Wu CJ. Evolving understanding of the CLL genome. *Semin Hematol.* 2014 Jul;51(3):177-87.
241. Malek S. Molecular biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *Adv Exp Med Biol.* 2013;792:193-214.
242. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol.* 2014 Feb;24:71-81.
243. Binet JL. Treatment of chronic lymphocytic leukaemia. French Co-operative Group on CLL. *Baillieres Clin Haematol.* 1993 Dec;6(4):867-78.

244. Maurer C, Hallek M. [Chronic lymphocytic leukemia]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2013 Oct;138(42):2153-66.
245. Vroblova V, Smolej L, Vrbacky F, Jankovicova K, Hrudkova M, Maly J, et al. Biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2009;52(1):3-8.
246. Abrisqueta P, Pereira A, Rozman C, Aymerich M, Gine E, Moreno C, et al. Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980-2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood.* 2009 Sep 3;114(10):2044-50.
247. Zanesi N, Balatti V, Bottoni A, Croce CM, Pekarsky Y. Novel insights in molecular mechanisms of CLL. *Curr Pharm Des.* 2012;18(23):3363-72.
248. Visentin A, Facco M, Frezzato F, Castelli M, Trimarco V, Martini V, et al. Integrated CLL Scoring System, a New and Simple Index to Predict Time to Treatment and Overall Survival in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2015 Oct;15(10):612-20 e5.
249. Brachtl G, Pinon Hofbauer J, Greil R, Hartmann TN. The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol.* 2014 Mar;93(3):361-74.
250. Thompson PA, Tam CS. CD38 expression in CLL: a dynamic marker of prognosis. *Leuk Lymphoma.* 2014 Jan;55(1):1-2.
251. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2004 Aug 26;351(9):893-901.
252. Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2005 Mar 1;105(5):2036-41.
253. Ottaggio L, Viaggi S, Zunino A, Zupo S, Rossi E, Spriano M, et al. Chromosome aberrations evaluated by comparative genomic hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with CD38 expression. *Haematologica.* 2003 Jul;88(7):769-77.
254. Xia Y, Lu RN, Li J. Angiogenic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2012 Oct;36(10):1211-7.
255. Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E. All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leuk Res.* 2004 Mar;28(3):243-8.
256. Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res.* 1999 Feb 1;59(3):728-33.

257. Baban D, Murray J, Earl H, Kerr D, Seymour L. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor expression in chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Oncol*. 1996 Jan;8(1):29-34.
258. Wang YH, Fan L, Xu W, Li JY. Detection methods of ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Exp Med*. 2012 Jun;12(2):69-77.
259. Zucchetto A, Bomben R, Dal Bo M, Bulian P, Benedetti D, Nanni P, et al. CD49d in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlated expression with CD38 and prognostic relevance. *Leukemia*. 2006 Mar;20(3):523-5; author reply 8-9.
260. Buggins AG, Levi A, Gohil S, Fishlock K, Patten PE, Calle Y, et al. Evidence for a macromolecular complex in poor prognosis CLL that contains CD38, CD49d, CD44 and MMP-9. *Br J Haematol*. 2011 Jul;154(2):216-22.
261. Zenz T, Dohner H, Stilgenbauer S. Genetics and risk-stratified approach to therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007 Sep;20(3):439-53.
262. Jain N, O'Brien S. Initial treatment of CLL: integrating biology and functional status. *Blood*. 2015 Jul 23;126(4):463-70.
263. Mizia-Malarz A, Sobol G, Wos H. [Proangiogenic factors: vascular-endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor--the characteristics and function]. *Przegl Lek*. 2008;65(7-8):353-7.
264. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000 Sep 15;96(6):2240-5.
265. Vrbacky F, Nekvindova J, Rezacova V, Simkovic M, Motyckova M, Belada D, et al. Prognostic relevance of angiopoietin-2, fibroblast growth factor-2 and endoglin mRNA expressions in chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma*. 2014;61(5):585-92.
266. Gora-Tybor J, Szemraj J, Robak T, Jamroziak K. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor type A (VEGFA) and VEGF receptor type 2 (VEGFR2) gene polymorphism in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2015 Feb;54(2):139-43.
267. Feliers D, Chen X, Akis N, Choudhury GG, Madaio M, Kasinath BS. VEGF regulation of endothelial nitric oxide synthase in glomerular endothelial cells. *Kidney Int*. 2005 Oct;68(4):1648-59.
268. Ugarte-Berzal E, Redondo-Munoz J, Eroles P, Del Cerro MH, Garcia-Marco JA, Terol MJ, et al. VEGF/VEGFR2 interaction down-regulates matrix metalloproteinase-9 via STAT1 activation and inhibits B chronic lymphocytic leukemia cell migration. *Blood*. 2010 Jan 28;115(4):846-9.
269. Ghobrial IM, Bone ND, Stenson MJ, Novak A, Hedin KE, Kay NE, et al. Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma. *Mayo Clin Proc*. 2004 Mar;79(3):318-25.

270. Newey SE, Tsaknakis G, Khoo CP, Athanassopoulos T, Camicia R, Zhang Y, et al. The hematopoietic chemokine CXCL12 promotes integration of human endothelial colony forming cell-derived cells into immature vessel networks. *Stem Cells Dev.* 2014 Nov 15;23(22):2730-43.
271. Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, Saitoh Y, Arita Y, Shinohara K, et al. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):2181-7.
272. Li JK, Yu L, Shen Y, Zhou LS, Wang YC, Zhang JH. Inhibition of CXCR4 activity with AMD3100 decreases invasion of human colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol.* 2008 Apr 21;14(15):2308-13.
273. Monteagudo C, Ramos D, Pellin-Carcelen A, Gil R, Callaghan RC, Martin JM, et al. CCL27-CCR10 and CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor mRNA expression ratio: new predictive factors of tumor progression in cutaneous malignant melanoma. *Clin Exp Metastasis.* 2012 Aug;29(6):625-37.
274. Majid A, Lin TT, Best G, Fishlock K, Hewamana S, Pratt G, et al. CD49d is an independent prognostic marker that is associated with CXCR4 expression in CLL. *Leuk Res.* 2011 Jun;35(6):750-6.
275. Ugarte-Berzal E, Bailon E, Amigo-Jimenez I, Vituri CL, del Cerro MH, Terol MJ, et al. A 17-residue sequence from the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) hemopexin domain binds alpha4beta1 integrin and inhibits MMP-9-induced functions in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Biol Chem.* 2012 Aug 10;287(33):27601-13.
276. Schlange T, Matsuda Y, Lienhard S, Huber A, Hynes NE. Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation. *Breast Cancer Res.* 2007;9(5):R63.
277. Chinni SR, Yamamoto H, Dong Z, Sabbota A, Bonfil RD, Cher ML. CXCL12/CXCR4 transactivates HER2 in lipid rafts of prostate cancer cells and promotes growth of metastatic deposits in bone. *Mol Cancer Res.* 2008 Mar;6(3):446-57.
278. Staubach S, Hanisch FG. Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert Rev Proteomics.* 2011 Apr;8(2):263-77.
279. Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. *Leukemia.* 2009 Jan;23(1):43-52.
280. Zaitseva L, Murray MY, Shafat MS, Lawes MJ, MacEwan DJ, Bowles KM, et al. Ibrutinib inhibits SDF1/CXCR4 mediated migration in AML. *Oncotarget.* 2014 Oct 30;5(20):9930-8.
281. Pepper C, Buggins AG, Jones CH, Walsby EJ, Forconi F, Pratt G, et al. Phenotypic heterogeneity in IGHV-mutated CLL patients has prognostic impact and identifies a subset with increased sensitivity to BTK and PI3Kdelta inhibition. *Leukemia.* 2015 Mar;29(3):744-7.
282. Castejon R, Vargas JA, Romero Y, Briz M, Munoz RM, Durantez A. Modulation of apoptosis by cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry.* 1999 Oct 15;38(5):224-30.

283. Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res.* 1996 May 1;56(9):2013-6.
284. Delli Carpini J, Karam AK, Montgomery L. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. *Angiogenesis.* 2010 Mar;13(1):43-58.
285. Nuckel H, Frey UH, Bau M, Sellmann L, Stanelle J, Durig J, 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 Jan 1;109(1):290-7.
286. Kim JG, Sohn SK, Chae YS, Cho YY, Bae HI, Yan G, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with gastric cancer. *Ann Oncol.* 2007 Jun;18(6):1030-6.
287. Heist RS, Zhai R, Liu G, Zhou W, Lin X, Su L, et al. VEGF polymorphisms and survival in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Feb 20;26(6):856-62.
288. Lozano-Santos C, Martinez-Velasquez J, Fernandez-Cuevas B, Polo N, Navarro B, Millan I, et al. Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) gene polymorphisms have an impact on survival in a subgroup of indolent patients with chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One.* 2014;9(6):e101063.
289. Bradbury PA, Zhai R, Ma C, Xu W, Hopkins J, Kulke MJ, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms and esophageal cancer prognosis. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 15;15(14):4680-5.
290. Demacq C, Vasconcellos VB, Izidoro-Toledo TC, da Silva Silveira V, Canalle R, Queiroz RG, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelial nitric oxide synthase (NOS3) polymorphisms are associated with high relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Clin Chim Acta.* 2010 Sep 6;411(17-18):1335-40.
291. Garcia-Closas M, Malats N, Real FX, Yeager M, Welch R, Silverman D, et al. Large-scale evaluation of candidate genes identifies associations between VEGF polymorphisms and bladder cancer risk. *PLoS Genet.* 2007 Feb 23;3(2):e29.
292. Wrobel T, Mazur G, Dzietczenia J, Gebura K, Kulickowski K, Bogunia-Kubik K. VEGF and bFGF gene polymorphisms in Polish patients with B-CLL. *Med Oncol.* 2013 Mar;30(1):456.
293. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res.* 2000 Nov-Dec;37(6):443-8.
294. Rodrigues P, Furriol J, Tormo E, Ballester S, Lluch A, Eroles P. The single-nucleotide polymorphisms +936 C/T VEGF and -710 C/T VEGFR1 are associated with breast cancer protection in a Spanish population. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jun;133(2):769-78.
295. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol.* 1999 Dec;60(12):1245-9.

296. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, et al. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer*. 2003 Sep 10;106(4):468-71.
297. Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med*. 2013 Jan;17(1):30-54.
298. Balakrishnan K, Burger JA, Fu M, Doifode T, Wierda WG, Gandhi V. Regulation of Mcl-1 expression in context to bone marrow stromal microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasia*. 2014 Dec;16(12):1036-46.
299. Crowther-Swanepoel D, Qureshi M, Dyer MJ, Matutes E, Dearden C, Catovsky D, et al. Genetic variation in CXCR4 and risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009 Nov 26;114(23):4843-6.
300. Dommange F, Cartron G, Espanel C, Gallay N, Domenech J, Benboubker L, et al. CXCL12 polymorphism and malignant cell dissemination/tissue infiltration in acute myeloid leukemia. *FASEB J*. 2006 Sep;20(11):1913-5.
301. de Oliveira KB, Guembarovski RL, Oda JM, Mantovani MS, Carrera CM, Reiche EM, et al. CXCL12 rs1801157 polymorphism and expression in peripheral blood from breast cancer patients. *Cytokine*. 2011 Aug;55(2):260-5.

ANEXOS

1. Compromiso ético de los investigadores

La investigadora principal responsable y el resto de investigadores del proyecto que lleva por título “Papel de los receptores angiogénicos del VEGF en la apoptosis y migración de la leucemia linfática crónica-B: correlación con los receptores de quimiocinas CXCR4/CCR7”, que se enmarca dentro de la línea de investigación de la Unidad de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, se comprometen, a que cada sujeto sea tratado según las normas éticas aplicables a la investigación en humanos, establecidas en la Declaración de Helsinki (Junio 1964), y sus actualizaciones de Tokio (Octubre 1975), Venecia (Octubre 1983) y Hong Kong (Septiembre de 1989), en la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO y los acuerdos del Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la Dignidad del Ser Humano Frente a las Aplicaciones de la Biología y de la Medicina (París, Enero de 1998 y ratificado el Julio de 1999).

2. Información para cada sujeto participante en el estudio

El Proyecto de Investigación titulado “Papel de los receptores angiogénicos del VEGF en la apoptosis y migración de la leucemia linfática crónica-B: correlación con los receptores de quimiocinas CXCR4/CCR7”, ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

El estudio analiza los niveles de expresión de los receptores VEGF en las células de sangre periférica y estudiar las rutas de señalización al interior de la célula. Las células aisladas de las muestras de pacientes se someterán al tratamiento con sustancias bloqueantes o activadoras de las rutas mediadas por VEGF, y se estudiará su efecto en la supervivencia, proliferación y migración de linfocitos B. El objetivo de estudio es conocer la importancia de estas dos rutas de señalización en estos procesos y la posible aplicación de sus inhibidores en el tratamiento de B-L LC especialmente para frenar la progresión de la enfermedad.

Las pruebas a las que será sometido/a no representan ningún riesgo para su salud, ni tienen efectos secundarios indeseables.

Tanto los datos como las muestras obtenidas podrán ser utilizados en futuros estudios de similares características y hayan aprobados por el comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia o similar y que mantengan los compromisos éticos aplicables a la investigación con muestras humanas.

Sus datos, al igual que los de todos los participantes, son totalmente confidenciales y el Investigador garantiza esta confidencialidad.

Su participación, totalmente voluntaria, puede ayudar a conocer mejor las causas de esta enfermedad y otros factores modificadores.

Junto a esta información deberá comentar con cualquiera de los investigadores los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación.

Valencia, __de _____de 200_

Firma del participante.

3. Consentimiento informado

Yo _____

He sido informado por el Dr. _____, colaborador del estudio arriba mencionado, y declaro que he recibido suficiente información y he comprendido los objetivos de estos estudios.

Comprendo que:

- Mi participación es voluntaria
- Puedo retirarme cuando lo desee sin tener que dar explicaciones.
- Mis muestras y datos pueden ser utilizados para estudios posteriores que tengan objetivos similares a los propuestos en el presente estudio y hayan sido aprobados por el mismo comité ético o uno similar.
- Mis datos, al igual que los de todos los participantes, son totalmente confidenciales y el investigador garantiza esta confidencialidad.

Sabiendo todo esto, doy voluntariamente mi conformidad para participar en estos estudios.

Además, deseo:

- recibir información sobre los datos resultantes del estudio: SI/NO (tachar lo que no proceda).
- que otros miembros de mi familia, afectos o no, sean informados sobre los resultados del este estudio: SI/NO (tachar lo que no proceda)

Valencia, __de _____ de 200__

Firma del participante

Tabla de criterios de valoración de la respuesta.

Variable	Respuesta Completa	Respuesta Parcial	Progresión de enfermedad
Grupo A			
Adenopatías	Ninguna > 1.5 cm	Reducción $\geq 50\%$	Incremento $\geq 50\%$
Hepatomegalia	ausencia	Reducción $\geq 50\%$	Incremento $\geq 50\%$
Esplenomegalia	ausencia	Reducción $\geq 50\%$	Incremento $\geq 50\%$
Cifra de linfocitos	$< 4 \times 10^9/L$	Reducción $\geq 50\%$	Incremento $\geq 50\%$
Médula ósea	Normocelular, con linfocitos $< 30\%$; ausencia de nódulos linfocitarios Médula ósea hipoceular define RCi	50% reducción en el infiltrado ó presencia de módulos linfoides	
Grupo B			
Plaquetas	$> 100 \times 10^9/L$	$> 100 \times 10^9/L$ ó $\geq 50\%$ de mejoría	Reducción $\geq 50\%$ atribuible a su LLC
Hemoglobina	> 11 g/dL	> 11 g/dL ó $\geq 50\%$ de mejoría	Descenso > 2 gr/dL atribuible a su LLC
Neutrófilos	$> 0.4 \times 10^9/L$	$> 0.4 \times 10^9/L$ ó $\geq 50\%$ de mejoría	

Respuesta completa: se deben cumplir todos los criterios; respuesta parcial: al menos 2 criterios del grupo A y uno del grupo B; enfermedad estable: no alcanza respuesta parcial ni tampoco progresión de enfermedad; RCi: respuesta completa incierta

Hallek M 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.

