

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

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



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

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

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

Every journey begins with one step. Every cancer begins with a single cell. *(Terry J Hamblin)*

Consider, by the time you reach 40... your 30 trillion or so cells
have each divided themselves a few thousand times.
How could it possibly not be that a few of those cells would not
have banded together in that state of cytological anarchy
which leads to cancer and death? *(John Diamond)*

INTRODUCCIÓ

1. LES NEOPLÀSIES LIMFOIDES: ORIGEN, DESENVOLUPAMENT I CLASSIFICACIÓ

El terme **càncer** (del grec *karkinoma* i del llatí *cancer* o *cancri*, que significa cranc) agrupa un conjunt de malalties diferents que presenten, com a característica comuna, una proliferació cel·lular descontrolada provocada per alteracions en el material genètic de determinades cèl·lules de l'organisme. El primer estadi de desenvolupament d'un càncer consisteix en l'augment descontrolat del número de cèl·lules que formen un teixit concret, apareixent el que s'anomena **tumor** o **neoplàsia**. Posteriorment, aquestes cèl·lules poden adquirir característiques noves que permetin la seva independència del teixit d'origen i posterior disseminació a nous teixits i òrgans, produint-se el fenomen conegut com a **metàstasi**. Ambdós estadis són necessaris per definir el càncer. Si només es dona el primer llavors es parla d'un **tumor benigne**, en què el pacient assoleix una curació completa. Per altra banda, quan es desenvolupa una metàstasi, es considera un **tumor maligne** o **càncer**, amb pitjor pronòstic i difícil tractament. Cada tipus de càncer té unes característiques específiques, que depenen principalment de la cèl·lula d'origen i les causes que el desencadenen (**Figura 1**)¹.

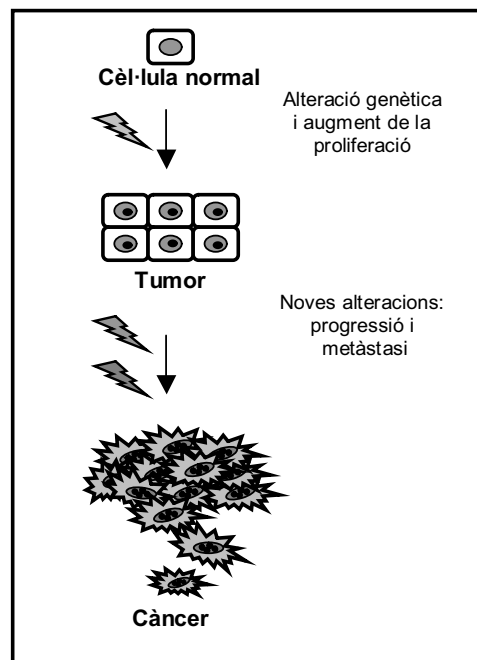


Figura 1: Estadis de desenvolupament d'un càncer

Les **neoplàsies limfoides** o **síndromes limfoproliferatives** constitueixen un grup de desordres proliferatius que s'originen a partir del creixement descontrolat de les diferents cèl·lules que formen el sistema immunitari, particularment els limfòcits i els seus precursors. Tot i que, a nivell global, aquest tipus de malalties tenen característiques comunes, la seva biologia i manifestacions clíniques són molt diverses degut a l'existència d'una gran complexitat cel·lular i funcional en les poblacions d'origen, així com a la heterogeneïtat dels mecanismes patogènics que contribueixen al seu desenvolupament i progressió a variants més agressives de la malaltia ^{2,3}.

La classificació de les neoplàsies limfoides

La classificació de les síndromes limfoproliferatives és molt complexa degut a la gran varietat de cèl·lules a partir de les quals es poden originar. Durant els anys 70 existien diferents classificacions de limfomes, com ara els sistemes de Rappaport, Kiel, Lukes & Collins, Dorfman, d'Investigació del Grup Nacional Britànic de Limfomes i els de la WHO (Organització mundial de la salut, de l'anglès *World Health Organization*), així com el sistema de classificació de la *Working Formulation*. Cada tipus de classificació presentava les seves mancances específiques i no feia servir la mateixa terminologia per cada tipus de limfoma ni els mateixos criteris de diagnòstic, dificultant el procés científic i l'intercanvi de coneixement ⁴. Per aquesta raó l'any 1993 el Grup Internacional d'Estudi dels Limfomes va publicar la primera classificació de neoplàsies limfoides consensuada i revisada a través de la REAL (Classificació revisada de neoplàsies limfoides europeoamericana, de l'anglès *Revised European American classification of Lymphoid neoplasms*), que va identificar els diferents tipus de limfomes com a entitats concretes a partir de la seva morfologia, immunofenotip i genètica; tot definint entitats clinicopatològiques determinades. Més endavant aquesta classificació es va actualitzar sota la supervisió de la WHO, a través de la *Society for Haematopathology* i la *European Association of Haematopathology*, essent aquesta la que encara s'utilitza actualment ^{2,5}. Tot i això, els criteris del sistema de classificació de les neoplàsies limfoides han anat canviant i actualitzant-se en els últims anys; passant de basar-se principalment en la morfologia i l'immunofenotip cel·lulars a incloure paràmetres biològics i clínics, com ara la supervivència del pacient o la resposta al tractament.

Els processos limfoproliferatius es poden presentar en forma de **limfoma** (massa sòlida de cèl·lules tumorals), de **leucèmia** (cèl·lules tumorals en circulació sanguínia) o d'ambdues a la vegada. La classificació de la WHO distingeix bàsicament entre dos tipus de limfomes: el **limfoma o malaltia de Hodgkin** i els **limfomes No Hodgkin** (NHL, de l'anglès *Non-Hodgkin's lymphoma*), que al seu torn inclouen els limfomes derivats de la cèl·lula B i els limfomes derivats de la cèl·lula T/Natural Killer.

- 1. Limfoma o malaltia de Hodgkin:** deriva majoritàriament de la proliferació de limfòcits B, els quals han perdut l'expressió dels antígens característics de les cèl·lules B i T; i especialment l'antigen CD45, que és comú a la línia leucocitària. Les cèl·lules típiques del limfoma de Hodgkin tenen una morfologia molt peculiar i s'anomenen cèl·lules de *Reed-Sternberg*, les quals normalment són multinucleades i no s'assemblen a cap altra cèl·lula ja existent a l'organisme^{6,7}. El seu desenvolupament es dona per mecanismes que no es coneixen del tot bé, encara que s'ha vist que la infecció pel virus d'Epstein-Barr pot augmentar el risc a patir aquesta malaltia, que és més freqüent en persones joves^{8,9}.
- 2. Limfoma No Hodgkin (NHL):** existeix una gran varietat d'entitats dins del grup dels NHL, que es poden dividir bàsicament en NHL derivats de cèl·lula B (70%) i NHL derivats de cèl·lula T/Natural Killer (30%). També es poden classificar en funció del grau de desenvolupament de la cèl·lula d'origen: **limfomes limfoblàstics**, quan les cèl·lules d'origen són immadures i provenen d'òrgans limfoides primaris o centrals (medul·la òssia, tim); o en **limfomes de cèl·lules perifèriques**, quan el limfoma prové de cèl·lules madures efectores circulants, que es troben a compartiments perifèrics (sang, melsa, ganglis). Un tercer criteri de divisió entre diferents tipus de NHL és el que distingeix entre **NHL de baix grau**, que són limfomes de curs indolent, amb baixa proliferació, curs poc agressiu, supervivència relativament llarga i difícil curació en estat avançat; i **NHL d'alt grau**, amb alt índex proliferatiu, agressius i bona capacitat de resposta al tractament en molts casos^{2,3}.

Les causes biològiques de l'aparició dels NHL són diverses, però generalment i com s'esdevé en la gran majoria de tipus de càncers, aquests es desencadenen a partir de lesions genètiques que adquireixen les cèl·lules d'origen. Aquestes alteracions provoquen l'activació de determinats **oncogens** i/o la inactivació de

gens supressors de tumors. Els oncogens són formes mutades de gens normals, anomenats proto-oncogens, que un cop activats estimulen el creixement i proliferació de les cèl·lules tumorals. Per altra banda els gens supressors de tumors regulen processos cel·lulars clau, com ara el cicle cel·lular, evitant la transformació tumoral de les cèl·lules. Un dels principals mecanismes d'activació d'oncogens és la presència de **translocacions** cromosòmiques, que impliquen un reordenament del material cromosòmic. Aquestes alteracions poden ser recurrents en determinats tipus de limfomes, i generalment impliquen la juxtaposició de proto-oncogens que regulen el creixement, la supervivència i la diferenciació cel·lulars a seqüències reguladores de la transcripció de gens que s'expressen en abundància durant el desenvolupament fisiològic dels limfòcits. En molts casos aquestes translocacions són suficients per iniciar els processos de tumorigènesi, i es produeixen durant els primers estadis de desenvolupament de la neoplàsia. A partir d'aquest punt poden aparèixer alteracions genètiques secundàries que s'acumulin i contribueixin a l'evolució i progressió del tumor a formes més agressives de la malaltia. Dins d'aquestes alteracions es troben els guanys i pèrdues de material cromosòmic, les mutacions puntuals en proto-oncogens o les microdeleccions de gens supressors de tumors, entre d'altres. També s'ha vist que, comparat amb altres tipus de tumors, els NHL tenen un genoma relativament estable, essent poc freqüents els fenòmens d'inestabilitat de microsatèl·lits ^{10,11}.

Els NHL són el cinquè grup de tumors que apareix amb més freqüència en ambdós sexes, especialment en els països més desenvolupats. Sembla ser que existeixen certs factors que poden predisposar a patir aquest tipus de limfomes, com ara les alteracions del sistema immunitari (immunodeficiències i malalties autoimmunes), la infecció per alguns virus (virus de la immunodeficiència humana, Epstein-Barr, herpesvirus-8, hepatitis C) o bacteris (*Helicobacter pylori*); així com l'exposició a radiacions ultraviolades i a determinades substàncies tòxiques. Per altra banda, s'han descrit fenòmens d'agregació familiar en diferents NHL; i tot i que els mecanismes implicats no es coneixen bé, s'ha suggerit que la combinació de factors genètics i ambientals contribueix al seu desenvolupament ^{2,12,13}.

Els Limfomes No Hodgkin de cèl·lules B

Els NHL de cèl·lules B tenen un immunofenotip molt ben definit, ja que tots expressen CD19, CD20, CD22 i CD79, antigens típics de cèl·lula B; i altres marcadors característics de cada subtipus de limfoma. Aquests desordres limfoproliferatius deriven de limfòcits B que es troben en diferents estadis de maduració i diferenciació, així que és molt important conèixer els processos de desenvolupament normal d'aquestes cèl·lules per entendre l'origen de la gran varietat de NHL existents ².

Els teixits que formen el sistema immunitari es divideixen bàsicament en dos grans grups: els **òrgans limfoides centrals** (medul·la òssia i tim), i els **òrgans limfoides perifèrics** (sang, melsa, ganglis limfàtics i associats a mucoses). Els limfòcits s'originen als òrgans limfoides centrals a partir de cèl·lules mare precursoras. En aquest compartiment pateixen un primer procés de diferenciació i reordenen els gens de les **immunoglobulines**, un tipus de proteïnes unides a membrana que són altament específiques per determinats antigens, esdevenint limfòcits madurs. Aquests limfòcits es troben en estat de repòs i no proliferen, ja que necessiten reaccionar amb un antigen determinat per activar-se. Tot seguit migren als òrgans limfoides perifèrics i recirculen per tot el cos, entrant dins dels **fol·licles limfoides primaris i secundaris**, que són uns compartiments on s'acumulen les cèl·lules B. És als fol·licles limfoides secundaris on els limfòcits tenen l'oportunitat d'entrar en contacte amb diferents antigens a través de les anomenades cèl·lules presentadores d'antigen. Aquesta interacció pot desencadenar canvis genètics a les cèl·lules B, com ara la hipermutació somàtica de les regions variables del gen de les immunoglobulines. Aquest procés desencadena l'augment de l'afinitat de la cèl·lula B per l'antigen, provocant la seva posterior evolució a cèl·lules B efectores o cèl·lules B de memòria. A més, els limfòcits ja activats poden abandonar el fol·licle per arribar a la medul·la òssia, on es transformaran en cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos ^{2,3}.

Els fol·licles limfoides secundaris consten de tres parts ben diferenciades, les quals tenen continguts cel·lulars amb propietats característiques: el **centre germinal**, on les cèl·lules proliferen després d'haver-se trobat amb l'antigen; el **mantell**, zona formada per limfòcits madurs, i una **regió marginal**. La majoria de NHL derivats de cèl·lula B, que es troben desglossats a la **Taula 1**, s'originen durant els diferents

estadis de desenvolupament i progressió de la cèl·lula B dins dels fol·licles limfoides secundaris (**Figura 2**).

Taula 1. *Classificació dels NHL de cèl·lula B basada en el sistema REAL/WHO*

- I. Limfomes dels precursors de les cèl·lules B
 1. Leucèmia/limfoma limfoblàstic B (LBL, de l'anglès *LymphoBlastic Lymphoma*)

- II. Limfomes de cèl·lules B perifèriques
 2. Leucèmia limfàtica crònica B/Linfoma limfocític de cèl·lules petites/leucèmia prolimfocítica (CLL, de l'anglès *B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia/SLL*, de l'anglès *Small Lymphocytic Lymphoma*)
 3. Limfoma limfoplasmocític (LPL, de l'anglès *LymphoPlasmacytic Lymphoma*)
 4. Limfoma de cèl·lules del mantell (MCL, de l'anglès *Mantle Cell Lymphoma*)
 5. Limfoma fol·licular (FL, de l'anglès *Follicular Lymphoma*)
 6. Limfoma difús de cèl·lules grans B (DLBCL, de l'anglès *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*)
 7. Limfoma de la zona marginal extranodal de teixit limfoide associat a mucosa (MALT, de l'anglès *Mucosa Associated Lymphoid Tissue Type*)
 8. Limfoma de la zona marginal nodal (NMZL, de l'anglès *Nodal Marginal Zone Lymphoma*)
 9. Limfoma de la zona marginal esplènica (SMZL, de l'anglès *Splenic Marginal Zone Lymphoma*)
 10. Tricoleucèmia (HCL, de l'anglès *Hairy Cell Leukemia*)
 11. Plasmocitoma/Mieloma múltiple (MM, de l'anglès *Multiple Myeloma*)
 12. Limfoma de Burkitt (BL, de l'anglès *Burkitt Lymphoma*)

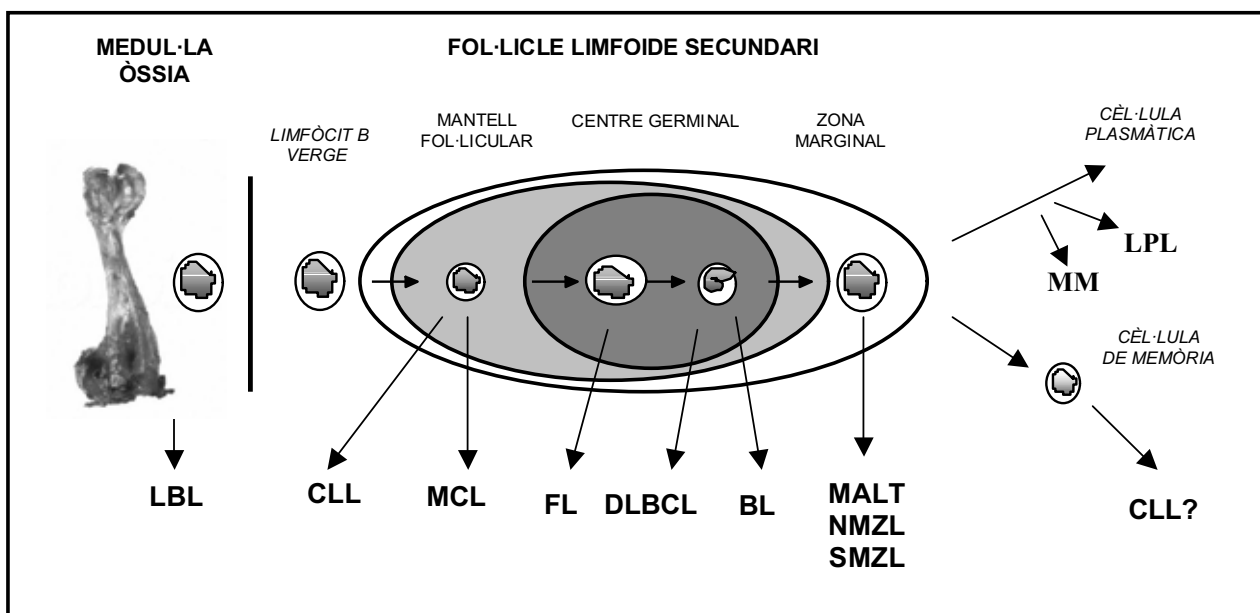


Figura 2: Desenvolupament de les cèl·lules B i els diferents NHL

Els NHL de cèl·lula B que s'han estudiat principalment en aquest treball són la **leucèmia limfàtica crònica (CLL)** i el **limfoma de cèl·lules del mantell (MCL)**. Aquestes dues entitats tenen en comú el fet que expressen l'antigen de diferenciació CD5, típic de cèl·lules T i també característic de cèl·lules B madures verges, és a dir, que encara no han tingut contacte amb l'antigen. Aquests dos tipus de limfomes també s'anomenen **limfomes de cèl·lula B petita**, ja que les cèl·lules són de mida relativament petita, similars o lleugerament més grans que els limfòcits normals. En el present estudi també s'han analitzat, en menor grau, el **limfoma fol·licular (FL)** i el **limfoma difús de cèl·lules grans B (DLBCL)**. A continuació es descriuran breument les característiques bàsiques de cada entitat esmentada.

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

Definició

La leucèmia limfàtica crònica de cèl·lules B (CLL) és el tipus de leucèmia més freqüent als països occidentals, constituïnt el 7% dels NHL existents. La gran majoria de pacients són majors de 50 anys, afectant el doble d'homes que de dones. Es pot presentar tant en forma de leucèmia com de limfoma, essent una neoplàsia limfoide de baix grau en què s'acumulen limfòcits petits i arrodonits que es distribueixen a medul·la òssia, sang perifèrica i ganglis limfàtics. Es creu que l'acumulació de cèl·lules

B és deguda principalment a alteracions en els mecanismes de mort cel·lular o apoptosi del limfòcit, però també a la sobreexpressió de certs gens, com ara BCL2. Recentment s'ha vist que les cèl·lules tumorals de CLL en sang perifèrica es troben predominantment en fase G₀; mentre que existeix una població proliferant en estructures especialitzades que es localitzen a la medul·la òssia i els ganglis limfàtics dels pacients, anomenades pseudofol·licles ¹⁴. Aquest compartiment de proliferació és més important del que inicialment es pensava, ja que s'ha observat que els limfòcits tumorals poden tenir taxes de duplicació més elevades que les de les cèl·lules B normals. Aquesta taxa de duplicació incrementada sembla correlacionar-se amb la capacitat de progressió de la malaltia; i indica que la CLL no és una malaltia estàtica donada per l'acumulació de limfòcits tumorals que no es moren, sinó que sorgeix a conseqüència d'una dinàmica alterada de les funcions de proliferació cel·lular i apoptosi ¹⁵.

Les causes d'aparició de les CLL no es coneixen del tot bé. Existeixen evidències que semblen indicar una tendència hereditària en la predisposició a patir CLL. S'han trobat famílies amb diferents membres de primer i segon grau afectats per la mateixa malaltia, i en les quals hi ha fenòmens d'anticipació, és a dir, la malaltia apareix més aviat en les segones generacions de familiars ¹⁶⁻¹⁸. Aquesta predisposició podria ésser deguda no tant a la presència de mutacions en gens encara no identificats sinó a un model poligènic en què combinacions de diferents al·lels augmentessin el risc a patir la malaltia ¹⁹.

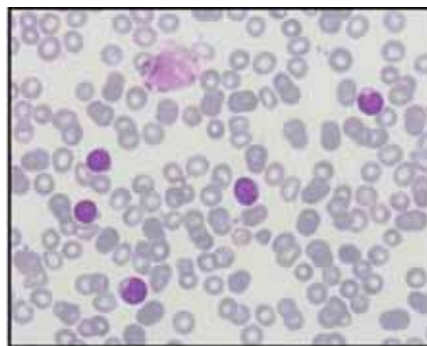


Figura 3: Imatge de cèl·lules tumorals de CLL

Immunofenotip i cèl·lula postulada d'origen

Les cèl·lules de CLL expressen CD5, CD19, CD20, CD22 (poc), CD79, CD23, CD43 i CD11c, mentre que són negatives per CD10 i ciclina D1 (CCND1). El fet que la gran majoria de casos expressin CD23 però no CCND1 ajuda a distingir-los dels limfomes

de cèl·lules del mantell (MCL), que també expressen CD5 i són limfomes de cèl·lula B petita^{20,21}.

Inicialment es creia que la cèl·lula d'origen de les CLL eren limfòcits B madurs que encara no havien tingut contacte amb cap antígen, però els estudis d'expressió gènica han assenyalat que les cèl·lules tumorals s'assemblen més als limfòcits B no proliferatius en estat de repòs que circulen en sang o bé a les cèl·lules B de memòria²². Els fenòmens d'hipermutació somàtica i la presència de mutacions en el gen de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgV_H) s'ha fet servir com a criteri per determinar el possible pas de les cèl·lules B tumorals pel fol·licle limfoide secundari i la trobada amb l'antigen. D'aquesta manera és possible identificar les cèl·lules B com a cèl·lules pre-germinals, de centre germinal o post-germinals²³. S'ha observat que en un conjunt de casos de CLL els limfòcits tumorals presenten mutacions en les IgV_H, és a dir, han patit processos d'hipermutació somàtica per augmentar l'afinitat del limfòcit per l'antigen amb què han interactuat. Les cèl·lules B que donen lloc a aquestes CLL correspondrien a limfòcits que ja han passat pel centre germinal, i aquest criteri ha permès distingir l'existència de dos subtipus de CLL que tenen clínica i pronòstic diferent²⁴. Curiosament, les cèl·lules B madures verges i les que ja han passat pel centre germinal són indistingibles morfològicament. Per altra banda, s'ha vist que la tria de la família dels gens de les IgV_H durant els processos de recombinació no es fa a l'atzar, de manera que hi ha determinades famílies que apareixen més freqüentment representades en els clons de cèl·lules B dels pacients de CLL que d'altres, cosa que també es relaciona amb l'estat mutacional de dits gens²⁵⁻²⁸.

Genètica

En les CLL no s'ha trobat cap translocació recurrent clau que expliqui l'inici dels processos neoplàsics, però sí que s'ha observat que prop del 80% dels casos tenen alteracions en el seu cariotip. La deleció de la regió de 13q14 és l'alteració genètica més freqüent, trobant-se aproximadament en el 50% dels casos. El 20% presenten trisomia del cromosoma 12, i també són freqüents les delecions de la regió de 6q21, 11q22-23 i 17p13; així com els guanys de les regions de 8q i 3q²⁹⁻³¹.

Clínica, pronòstic i progressió

La CLL acostuma a tenir un curs indolent, però no és curable amb els tractaments existents i el pacient té una supervivència mitjana d'uns 8-10 anys. Els casos en què

les cèl·lules tumorals no tenen mutacions de les IgV_H i que expressen alts nivells de la proteïna ZAP-70 semblen tenir pitjor pronòstic i un comportament més agressiu ³².

S'ha vist que alguns casos de CLL poden donar lloc a **leucèmia prolimfocítica de cèl·lules B**, que és una malaltia molt poc freqüent que també pot aparèixer *de novo* ³³. Per altra banda, aproximadament el 13% de CLL es transformen en un tipus de limfoma de cèl·lules grans d'alt grau, esdevenint el que es coneix com a **síndrome de Richter** (RS, de l'anglès *Richter Syndrome*). Tant la leucèmia prolimfocítica com el RS tenen un comportament altament agressiu i amb poca resposta al tractament, disminuint el temps de supervivència dels pacients. A més s'ha observat que les variants de RS presenten un augment del nombre d'alteracions citogenètiques ³⁴⁻³⁶.

El limfoma de cèl·lules del mantell (MCL)

Definició

El limfoma de cèl·lules del mantell (MCL) constitueix el 3-10% dels NHL i es dona en individus adults al voltant dels 60 anys, especialment en homes. Aquest tipus de limfoma es produeix per l'acumulació de limfòcits B madurs verges de mida petita o intermitja que tenen un nucli irregular, els quals creixen a partir de les zones del mantell dels fol·licles limfoides secundaris. Les cèl·lules tumorals es caracteritzen per tenir un alt índex proliferatiu, esdevenint el MCL una malaltia molt agressiva en què la majoria de casos no poden curar-se amb les teràpies que existeixen actualment ³⁷⁻⁴¹.

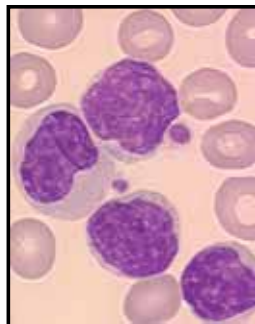


Figura 4: Imatge de cèl·lules tumorals de MCL

Immunofenotip i cèl·lula postulada d'origen

Les cèl·lules de MCL expressen CD5, com les CLL, CD19, CD20, CD22 i CD79. No acostumen a expressar CD23, a diferència de les CLL, CD10 ni CD11c. Virtualment tots els casos expressen CCND1.

Es creu que les cèl·lules del MCL provenen de limfòcits verges que encara no han passat pel centre germinal del fol·licle limfoide secundari, tot i que recentment s'ha comprovat que en el 25% dels casos es troben mutacions en les IgV_H⁴²⁻⁴⁴. Aquests casos tenen taxes de mutació més baixes que els limfomes que deriven clarament de cèl·lules B del centre germinal, com ara el FL. Per aquesta raó s'ha hipotetitzat que almenys un subgrup de MCL podria originar-se a partir de la zona marginal del fol·licle limfoide secundari o bé a través de cèl·lules B de memòria presents a la sang perifèrica que hagin patit estimulació antigènica independent de la que es dona al centre germinal⁴⁵. Per altra banda, els MCL que no tenen les IgV_H mutades semblen tenir un comportament clínic similar als casos mutats, contràriament al que passa en la CLL.

Genètica

S'ha vist en diversos estudis citogenètics que el MCL és una de les neoplàsies limfoides amb major nombre d'alteracions cromosòmiques numèriques i estructurals^{40,46}. Virtualment tots els casos presenten la translocació t(11;14)(q13;q32) entre el gen de la cadena pesada de les immunoglobulines i el de la CCND1, provocant-se'n la sobreexpressió (**Figura 9**). Aquesta fet sembla ser clau perquè s'iniciï el tumor, ja que la CCND1 és un gen regulador del cicle cel·lular i la seva alteració provoca un augment de la proliferació de les cèl·lules tumorals⁴⁷. Hi ha casos molt particulars de MCL que no expressen la CCND1 i que mantenen les mateixes característiques morfològiques i immunofenotípiques dels MCL clàssics^{48,49}. Curiosament, alguns d'aquests limfomes expressen la ciclina D2 i la ciclina D3, suggerint que aquestes ciclines poden substituir parcialment la funció de la CCND1⁴⁸.

Tot i això sembla que és necessària l'acumulació d'altres alteracions oncogèniques per a què s'acabi de desenvolupar el tumor, ja que s'ha vist que la sobreexpressió de CCND1 en ratolins, per si sola, no induïx la transformació tumoral dels limfòcits⁵⁰. S'han identificat tot un seguit d'alteracions genètiques secundàries que contribueixen a la patogènesi de la malaltia. Una de les més freqüents és la deleció de la regió cromosòmica 11q22-23. Dins d'aquesta zona s'inclou el gen ATM, que juga un paper

clau en la via de resposta al dany del DNA⁵¹⁻⁵³. Aquesta és, conjuntament amb la proliferació cel·lular, una de les vies més freqüentment descontrolades en aquest tipus de limfoma, podent-se trobar alterades al seu torn proteïnes activades per ATM, com ara CHK1 i CHK2^{54,55}. Una incorrecta actuació dels factors implicats en aquesta resposta al dany del DNA pot contribuir a l'augment de la inestabilitat genètica del tumor i a la seva progressió³⁹. En MCL també és freqüent trobar la pèrdua de la regió cromosòmica 17p, alteració que en la majoria de cops implica la pèrdua del gen p53. Aquest gen supressor de tumors és clau per la regulació de diverses vies cel·lulars, incloent el cicle cel·lular, la reparació del dany del DNA i l'activació dels processos apoptòtics. Moltes d'aquestes alteracions cromosòmiques s'associen específicament a variants més agressives de la malaltia i pitjor curs clínic^{46,56}.

Clínica, pronòstic i tractament

El MCL és un limfoma agressiu amb poca resposta al tractament, i en què els pacients presenten freqüents recaigudes. La supervivència acostuma a ser d'uns 3 a 4 anys, tot i que el comportament clínic pot esdevenir bastant variable, passant de formes pràcticament indolents amb una supervivència superior als 10 anys, a variants molt agressives amb una supervivència menor d'un any després del diagnòstic^{38,57}. L'aplicació d'estudis d'expressió gènica ha permès identificar conjunts de gens implicats en la patogènesi d'aquest tipus de limfoma, especialment els lligats a les vies de proliferació cel·lular, que permeten predir la supervivència dels pacients⁴⁸.

Citològicament existeixen dues formes de MCL: l'anomenada **típica** es defineix per tenir cèl·lules de mida petita a intermitja amb poc citoplasma i nucli irregular; mentre que la que es coneix com **blastoide** (MCL-B) es caracteritza per tenir cèl·lules més grans, amb un curs molt més agressiu de la malaltia. El terme blastoide inclou dues variants, la **blàstica** i la **pleomòrfica**, totes dues amb un alt índex proliferatiu i una supervivència promig de 2 anys³⁸. Aquestes formes blastoides poden aparèixer *de novo* o bé derivades d'un MCL típic. Tal i com ja s'observava en el cas de les CLL i el RS, les variants blastoides de MCL presenten un major nombre d'alteracions citogenètiques comparat amb els casos típics⁴⁶. També s'han identificat gens diferencialment expressats característics d'aquesta forma més agressiva de la malaltia, com certs factors implicats en el control del cicle cel·lular i la inhibició de l'apoptosi⁵⁸.

Pel que fa al tractament del MCL, normalment s'aplica quimioteràpia⁴¹. Dins d'aquesta pràctica terapèutica, el més freqüent és utilitzar la combinació CHOP (que

inclou ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina i prednisona), amb la qual s'obté un nombre elevat de remissions parcials i completes de la malaltia (20-80%); tot i que la majoria de pacients acaben recaient a la llarga. L'addició de rituximab, un anticòs monoclonal dirigit contra CD20 (antigen que presenten tant els limfòcits B normals com la majoria de limfòcits B tumorals) ha permès millorar la supervivència i la resposta al tractament dels malalts. També es fa servir l'hiperCVAD (combinació de CHOP i dosis altes de metotrexat i citarabina) combinat amb rituximab o bé el transplantament de cèl·lules mare.

El limfoma fol·licular (FL)

El limfoma fol·licular (FL) representa aproximadament el 22% del total de NHL existents. S'origina a partir de cèl·lules B del centre germinal del fol·licle limfoide secundari, i està format per dos tipus de cèl·lules: els centròcits, que predominen dins del limfoma i són cèl·lules petites amb citoplasma escàs i nuclis irregulars; i els centroblasts, que són dos o tres cops més grans que els limfòcits normals i que presenten un nucli vesicular. Aquests dos tipus cel·lulars proliferen als fol·licles dins d'una xarxa de cèl·lules dendrítiques fol·liculars que no són malignes, i cèl·lules T^{59,60}. La malaltia afecta principalment els ganglis limfàtics, la melsa i la medul·la òssia, i el seu curs clínic sol ser indolent, tot i que es considera una neoplàsia incurable. El 30% de FL poden progressar a formes més agressives de limfoma difús de cèl·lules grans B (DLBCL), amb pitjor pronòstic i difícil tractament^{60,61}.

A més d'expressar els antígens CD19, CD20, CD22 i CD79a, típics del limfòcit B, les cèl·lules de FL també expressen CD10 i BCL6. Gairebé tots els casos tenen anomalies citogenètiques, i es calcula que el 90% presenta la translocació t(14;18), que juxtaposa el gen BCL2 al gen de la cadena lleugera de les immunoglobulines, desencadenant-se'n la seva sobreexpressió. BCL2 és una proteïna mitocondrial que inhibeix l'apoptosi en certs tipus cel·lulars, com ara els limfòcits, i la seva desregulació contribueix a la supervivència de les cèl·lules tumorals. Per altra banda, estudis recents d'expressió gènica han identificat dos grups de FL en funció de l'expressió de certs gens per part de les cèl·lules normals del sistema immunitari que infiltren el tumor. Aquestes diferències semblen ser un reflex de la interacció entre el tumor i el seu microambient i impliquen comportaments clínics diferents^{22,62}.

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

El limfoma difús de cèl·lules grans B (DLBCL) constitueix el 40% dels NHL i agrupa un conjunt de desordres limfoproliferatius de cèl·lules grans B molt heterogeni tant pel que fa a la seva clínica, morfologia i genètica ⁶³. La majoria d'aquests tumors deriven de cèl·lules del centre germinal del fol·licle limfoide secundari, tot i que estudis recents d'expressió gènica han aconseguit distingir entre tres variants d'aquesta malaltia depenent de si les cèl·lules expressen gens típics de cèl·lula B del centre germinal (tipus GCB, de l'anglès *Germinal Center B-cell like*), de cèl·lula B activada (tipus ABC, de l'anglès *Activated B-Cell like*) o de cap dels dos subtipus (tipus III). També s'ha vist que aquests grups tenen mecanismes oncogènics i patrons d'alteracions cromosòmiques diferents ⁶⁴. Els DLBCL poden aparèixer de nou o bé derivar d'un limfoma fol·licular previ, i es caracteritzen per la proliferació difusa de cèl·lules grans amb un nucli que és, com a mínim, el doble de gran que el dels limfòcits madurs normals. Aquest tipus de limfoma és molt agressiu, tot i que es pot curar amb els tractaments existents en l'actualitat ⁶⁴⁻⁶⁶.

Els DLBCL normalment expressen CD19, CD20, CD22 i CD79. Alguns casos poden expressar altres antígens com CD5, CD10 i CD30. El 30% dels pacients presenten alteracions cromosòmiques de la regió de 3q27 que afecten l'expressió del gen BCL6, especialment en els casos que deriven d'una etapa anterior de FL. BCL6 codifica per un factor de transcripció essencial per la formació del centre germinal i la repressió de diversos gens, participant en els processos de limfomagènesi. També s'ha comprovat que el 20-30% dels DLBCL presenten la translocació arquetípica dels FL, la t(14;18), que implica la sobreexpressió de BCL2.

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

Un tumor es comença a formar quan una única cèl·lula adquireix una aberració genètica que la predisposa a acumular més alteracions consecutives en el seu genoma, les quals li confereixen un avantatge evolutiu respecte a les cèl·lules normals pel que fa al seu creixement i supervivència dins del teixit. Així doncs les cèl·lules alterades que formen el tumor provenen de la mateixa cèl·lula originària, és a dir, el tumor és una entitat **monoclonal**: totes les seves cèl·lules presenten les mateixes característiques genètiques bàsiques. Dins de la mateixa massa tumoral les cèl·lules filles poden anar patint diferents processos de diversificació que provoquin certa heterogeneïtat cel·lular de la població tumoral d'origen ¹.

Així doncs és necessària una situació d'**inestabilitat genètica** per a què es desenvolupi una neoplàsia. Aquesta inestabilitat està causada per la presència de determinades alteracions en les cèl·lules tumorals, com ara reordenaments cromosòmics, la pèrdua o guany de material genètic i/o la presència de mutacions en determinats gens. L'**alteració primària** que dona peu a la transformació d'una cèl·lula normal en cèl·lula tumoral és, molt freqüentment, la presència d'una translocació cromosòmica, com s'observa en la gran majoria dels limfomes de cèl·lules B ². Aquest fet succeeix durant la maduració i el desenvolupament fisiològic dels limfòcits, ja que el reordenament dels gens que codifiquen pel receptor de l'antigen introdueix talls a la doble cadena del DNA que predisposen a patir translocacions. A més, al centre germinal del fol·licle limfoide secundari tenen lloc els fenòmens d'hipermutació somàtica i canvi d'isotip dels gens de les immunoglobulines, que també poden provocar l'augment de la incidència d'alteracions cromosòmiques. A partir d'aquesta aberració inicial es van acumulant tot un seguit d'**alteracions secundàries** que van conduïnt al desajust dels diversos mecanismes encarregats de mantenir l'homeòstasi cel·lular ⁶⁷.

La cèl·lula tumoral, gràcies a l'acumulació de diverses alteracions en el seu genoma, adquireix tot un seguit de característiques que li permeten obtenir un avantatge de supervivència dins del teixit d'origen. Aquestes característiques impliquen la independència de la cèl·lula tumoral respecte els senyals de creixement i la insensibilitat als senyals inhibidors del creixement, un potencial de proliferació il·limitat, l'evasió dels mecanismes de mort cel·lular programada o apoptosi, la capacitat

d'angiogènesi (formació de nous vasos sanguinis que aportin nutrients a les cèl·lules tumorals), i el poder d'envair teixits nous de l'organisme, tot desenvolupant una metastasi ⁶⁷ (**Figura 5**). Així doncs, la tumorigènesi és un procés dinàmic i molt complex en què participen diferents factors que s'interrelacionen entre ells. A més s'ha de considerar la cèl·lula en el seu context tissular, ja que el microambient que envolta la població tumoral també actua en la formació del tumor. El conjunt de totes aquestes circumstàncies determinarà les característiques de la neoplàsia i el seu comportament biològic, així com la resposta al tractament.

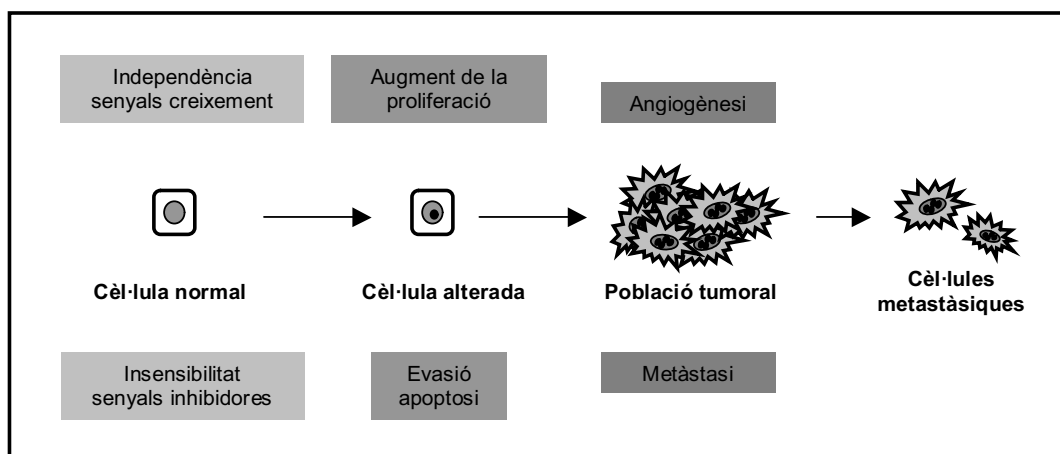


Figura 5: L'homeòstasi cel·lular i les seves alteracions

En el present treball s'han estudiat les alteracions de l'homeòstasi cel·lular de determinats NHL, bàsicament les que condueixen a canvis en la proliferació cel·lular i els mecanismes apoptòtics. També s'ha analitzat el conjunt de canvis globals que poden conduir a la progressió clínica d'una malaltia, com es passarà a descriure a continuació.

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

Proliferació i cicle cel·lular

La **proliferació cel·lular** consisteix en l'augment dels continguts de la cèl·lula, que per una banda creix en massa o mida i per l'altra duplica i segrega els seus cromosomes; per donar lloc, en una posterior divisió, a dues cèl·lules filles genèticament iguals. Aquest fenomen és necessari pel desenvolupament embrionari, així com pel recanvi cel·lular durant la vida dels organismes. La taxa de divisió depèn del tipus cel·lular i les necessitats fisiològiques, essent un procés altament regulat, ja que alteracions que produeixin un augment de la proliferació poden donar lloc a càncer ¹. El conjunt de processos que condueixen a la divisió d'una cèl·lula mare en dues cèl·lules filles rep el nom de **cicle cel·lular**. El cicle cel·lular consta de dues etapes: la **interfase** i la **mitosi**. La interfase és l'estadi durant el qual la cèl·lula genera tots els components necessaris per donar lloc a les dues cèl·lules filles, i es divideix en tres fases anomenades G₁, S i G₂. La mitosi o fase M comprèn la condensació del DNA en forma de cromosomes, el repartiment dels components cel·lulars entre les dues futures cèl·lules filles i la seva segregació. El pas d'una fase a la següent està molt ben regulat i implica l'actuació del que es coneix com a **punts de control** o *checkpoints*, que permeten que els diferents passos del procés es duguin a terme de forma correcta i seqüencial (**Figura 6**).

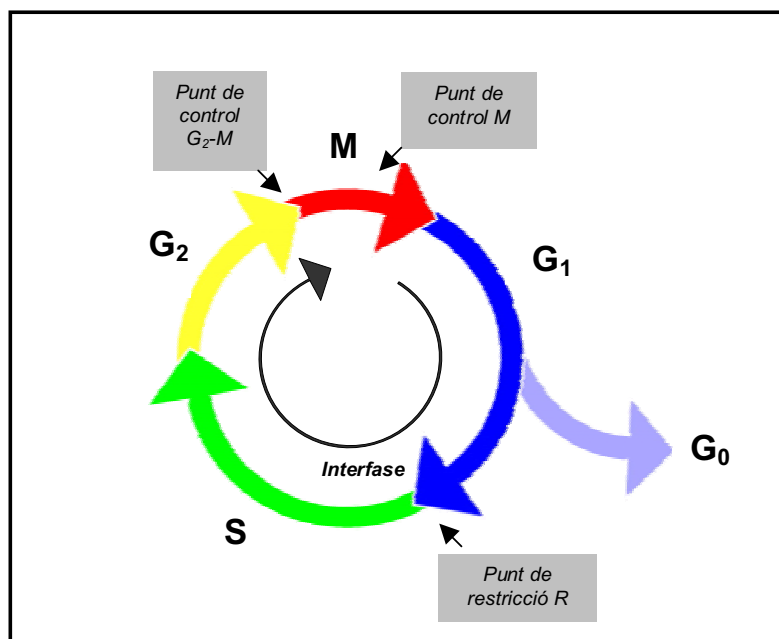


Figura 6: El cicle cel·lular: fases i punts de control

El cicle cel·lular s'inicia amb la fase **G₁**, en què la cèl·lula dobla la seva mida perquè se sintetitzen diversos components cel·lulars, especialment les proteïnes necessàries per la posterior replicació del DNA. Pot passar que la cèl·lula aturi el procés en aquest punt i es trobi en un estat de repòs que pot durar de dies a anys i que es coneix com fase **G₀**. Si la cèl·lula decideix continuar amb el seu cicle, llavors ha de passar pel **punt de control de restricció R**, en què es comprova que s'ha produït la massa cel·lular necessària i que els factors ambientals són els adequats. Aquest punt de control és molt estricte, i a partir d'aquí la resta de punts de control del cicle són independents dels estímuls externs a la cèl·lula. Tot seguit comença la fase **S**, en què es duplica el material genètic i s'expressen gens necessaris pel procés de replicació. Es continua amb la fase **G₂**, on les cèl·lules es preparen per a la mitosi imminent, actuant el **punt de control G₂-M**. Així es torna a controlar que la mida cel·lular és l'adequada i que el DNA s'ha sintetitzat de manera correcta i només un únic cop. Un cop finalitzada la interfase comença la mitosi o fase **M**, a través de la qual els cromosomes es condensen i es reparteixen a les dues cèl·lules filles conjuntament amb la resta de components cel·lulars. Dins d'aquest estadi hi ha el **punt de control M**, que entre altres coses controla que els cromosomes estiguin ben alineats al fus mitòtic constituït a la cèl·lula mare abans del seu repartiment entre les dues cèl·lules filles ⁶⁸.

El cicle cel·lular es produeix i regula gràcies a l'existència d'uns enzims molt particulars anomenats **cinases dependents de ciclines** (CDK, de l'anglès *cyclin dependent kinases*). Les CDK participen en el desenvolupament del cicle fosforilant certs factors i complexos moleculars que en permeten l'avanç. S'associen reversiblement a les **ciclines**, proteïnes que al seu torn controlen l'activitat de les CDK, tot i que les CDK també poden regular-se mitjançant la fosforilació per part d'altres tipus de cinases. Existeixen diferents complexos de CDK i ciclines, i els seus nivells oscil·len al llarg del cicle cel·lular. Durant l'etapa G₁ se sintetitzen les ciclines D (D1, D2 i D3) a partir de l'estimulació per factors de creixement. Les ciclines D estan implicades en el punt de control de restricció R. S'associen a **CDK4/CDK6**, formant complexos que actuen durant el transcurs de la fase G₁ principalment a través de la fosforilació de la proteïna **retinoblastoma** (Rb), produint-se l'expressió de gens necessaris per l'entrada a la fase S. Quan les cèl·lules s'acosten al punt de control de restricció R, el complex ciclina D-CDK4/CDK6 fosforila Rb, que es dissocia dels complexos als quals estava unit. Aquests complexos llavors s'activen i provoquen la transcripció de gens necessaris per la progressió del cicle cel·lular. Entre ells es troba la **ciclina E**, que s'associa al seu torn a **CDK2**, fosforilant també Rb. Aquesta

hiperfosforilació de Rb propicia l'alliberament del factor de transcripció **E2F**, transcrivint-se llavors gens necessaris per la finalització de l'estadi G₁ i el pas a la fase S. Entre aquests gens hi ha els que provoquen la síntesi de la **ciclina A**, que s'uneix a **CDK2** i juga un paper en el control de la síntesi del DNA. Més endavant es comença a transcriure la **ciclina B** (B1 i B2), que s'associa a **CDC2** (també anomenada CDK1). Aquest complex s'acumula al citoplasma durant la interfase i té una funció especialment rellevant en la transició entre les fases G₂ i M. A la vegada s'ha vist que CDC2 també pot unir-se a la ciclina A, contribuint conjuntament amb el complex ciclina B/CDC2 a la hiperfosforilació de Rb fins al final de la interfase i la mitosi ^{1,68-70} (**Figura 7**).

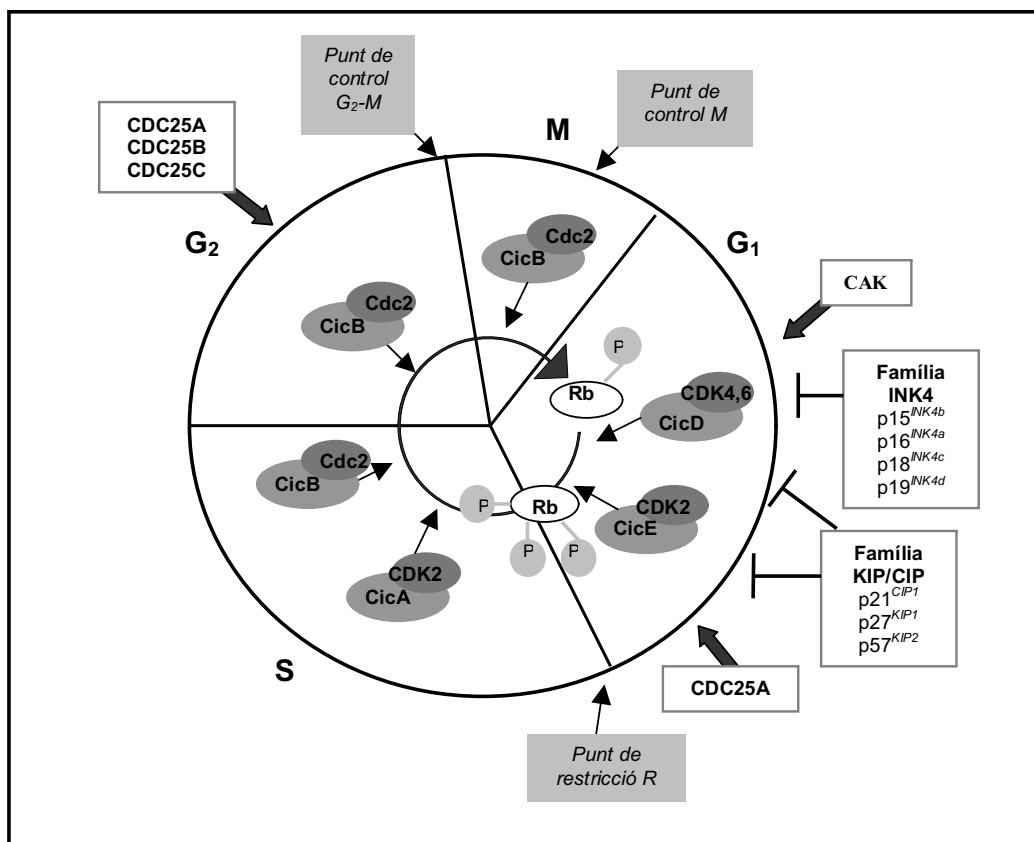


Figura 7: Els complexos ciclina-CDK en el cicle cel·lular i els seus reguladors

Regulació del cicle cel·lular

Els complexos ciclina-CDK estan estrictament regulats per controlar que s'activin només en moments molt concrets del cicle cel·lular. Aquesta regulació la duen a terme determinades famílies de proteïnes que actuen a diferents nivells, com ara a través de

la síntesi i degradació de les ciclines, la fosforilació/defosforilació activadora o inhibidora de les CDKs, o bé la inhibició de l'ensamblatge o l'activitat dels complexos (**Figura 7**).

Dins del grup de proteïnes que regulen els complexos ciclina-CDK per fosforilació es troben les **CAK** (de l'anglès *CDK-activating kinase*), que són uns complexos ciclina H/CDK7 que fosforilen CDK4 i l'activen ⁷¹. També existeixen les fosfatases **CDC25A**, **CDC25B** i **CDC25C**, que al seu torn actuen en diferents moments del cicle cel·lular defosforilant i activant els diversos complexos ciclina-CDK ⁷².

Per altra banda, la família de les proteïnes inhibidores o **CKI** (de l'anglès *CDK inhibitor*) juga un paper essencial en el control del cicle cel·lular. Dins de les CKI es troben dos grans grups: per una banda, les CKI que inhibeixen només les CDK (família **INK4**), i per l'altra les CKI que inhibeixen el complex ciclina-CDK un cop aquest ja s'ha format (família **Cip/Kip**). La família INK4 inclou les proteïnes p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} i p19^{INK4d}, que actuen inhibint CDK4 i CDK6 durant la fase G₁, evitant que aquestes cinases s'uneixin a la ciclina D i s'activen els complexos corresponents. En canvi la família Cip/Kip comprén p21^{CIP1}, p27^{KIP1} i p57^{KIP2}; que s'uneixen a diferents complexos ciclina-CDK. S'ha vist que p21^{CIP1} i p27^{KIP1} a determinades concentracions són necessaris per la correcta formació de certs complexos ciclina-CDK, de manera que una mateixa proteïna Cip/Kip pot tenir efectes diferents depenent del complex sobre el qual actua. En resum, els CKI poden bloquejar el cicle cel·lular i actuar com a gens supressors de tumors, com és el cas ben conegut de p16^{INK4a} i p21^{CIP1}. Les alteracions d'un o diversos membres d'aquesta família juguen un paper molt important en la progressió dels diferents càncers humans, ja que impliquen un augment de la proliferació cel·lular i un avantatge en el creixement tumoral ⁷³ (**Figura 7**).

A part d'aquestes regulacions directes dels complexos ciclina-CDK, també s'ha de tenir en compte la participació d'altres proteïnes que poden controlar la progressió del cicle cel·lular a nivell transcripcional. Aquest és el cas de **p53**, que és un factor de transcripció que juga un paper molt important en el control del cicle cel·lular en resposta a diversos estímuls, com ara el dany al DNA. P53 participa en aquesta regulació a diferents nivells, com ara a través de la inducció de p21^{CIP1}, neutralitzant l'activitat del complex ciclina E-CDK2 a la fase G₁ ^{74,75}. Per altra banda el locus genòmic de la proteïna p16^{INK4a} (locus INK4a/ARF) també codifica per un segon transcrit, **p14^{ARF}**, la funció principal del qual és estabilitzar p53 tot evitant que aquest s'uneixi a MDM2. **MDM2** codifica per una fosfoproteïna que actua com a reguladora

negativa de p53, ja que en media la degradació a través del proteosoma ⁷⁶. Al seu torn, l'activació de p53 induueix la transcripció de MDM2, de manera que ambdós gens es regulen mutuament. S'ha descrit que la presència de cert polimorfisme al promotor del gen MDM2 (T309G), el qual provoca l'augment de l'afinitat del factor de transcripció Sp1 per dita regió i pot desencadenar un increment de l'expressió de MDM2 per altres mecanismes ⁷⁷. Així doncs, la inactivació directa de p53 i/o p14^{ARF} i/o la sobreexpressió de MDM2 pot inactivar al seu torn la via de p53 a través de diferents nivells, contribuint a l'alteració de la proliferació cel·lular ⁷⁸ (**Figura 8**).

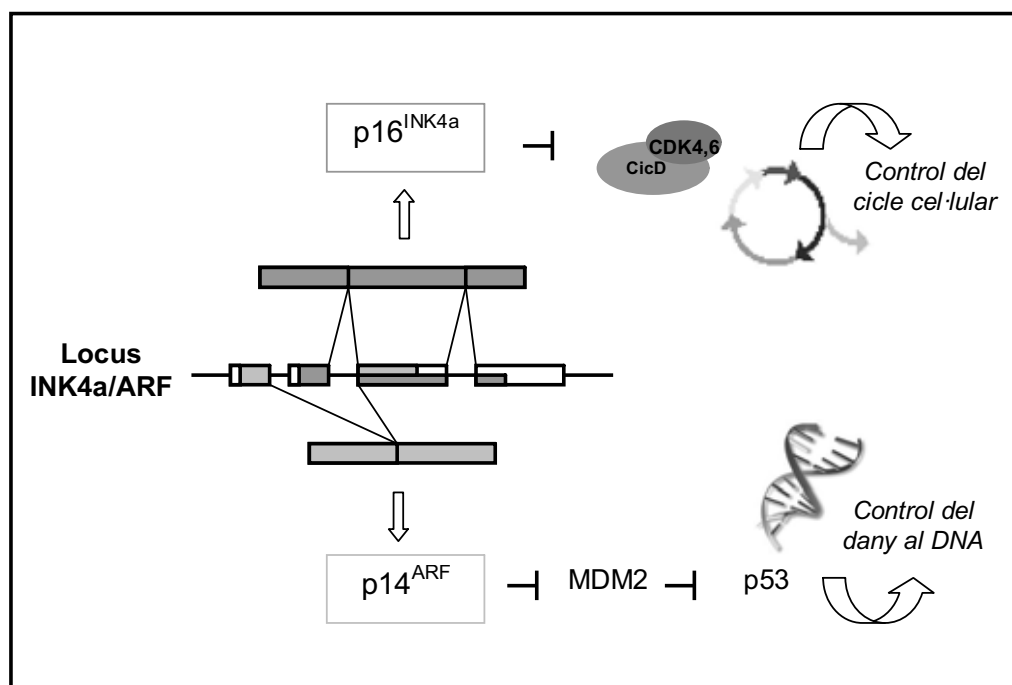


Figura 8: El locus INK4a/ARF: gens que codifica i vies cel·lulars implicades

També és important la participació del gen **c-Myc**, que és un factor de transcripció implicat en diverses vies, com ara la regulació del ciclo cel·lular, l'apoptosi, i els processos d'adhesió i diferenciació cel·lulars. Sembla ser que c-Myc augmenta la proliferació a través de la inducció de gens implicats directament en el ciclo, com ara les ciclins D1, D2, E i A, CDK4 i les fosfatases CDC25A. A més és capaç d'inhibir els CKI p15^{INK4b}, p21^{CIP1} i p27^{KIP1} ^{79,80}.

Les alteracions del ciclo cel·lular en els NHL de cèl·lules B

En el camp de les neoplàsies limfoides s'han identificat una gran varietat d'alteracions de gens implicats en el ciclo cel·lular que poden conduir a una proliferació

descontrolada ⁷⁸. De fet la quantificació dels nivells de proliferació cel·lular de diferents tipus de NHL és un criteri que s'utilitza des de fa temps com a indicador del pronòstic de la malaltia ⁸¹. Com s'ha comentat en la primera part d'aquesta introducció, els NHL es poden classificar de diferents maneres. Un dels mètodes de classificació més utilitzat i que es basa en criteris biològics i de comportament del tumor distingeix entre limfomes de baix i d'alt grau. Els limfomes de baix grau són generalment indolents i es caracteritzen per tenir un índex proliferatiu baix, en els quals el desenvolupament tumoral es dona principalment per l'acumulació d'alteracions que provoquen la inhibició dels processos apoptòtics, com és el cas de CLL i FL. Per altra banda, els limfomes d'alt grau tenen un índex proliferatiu més elevat i un comportament clínic agressiu, com a conseqüència principal de la desregulació dels mecanismes de control del cicle cel·lular, trobant dins d'aquest grup el MCL i el DLBCL.

Les CLL constitueixen el cas típic de limfoma de baix grau, en què les cèl·lules s'acumulen principalment per defectes en els mecanismes apoptòtics sense un gran augment de les taxes de proliferació cel·lular, com es comentarà més endavant ²⁰.

Els FL, així com les CLL, també tenen principalment afectades les vies de mort cel·lular programada. Tot i això s'ha vist que alguns casos poden adquirir alteracions del cicle cel·lular damunt de la base de lesions apoptòtiques primàries, provocant la progressió del FL a variants més agressives de la malaltia amb pitjor pronòstic. Aquestes alteracions lligades a la transformació dels FL són, majoritàriament, les que afecten els gens p53, p15^{INK4b}, p16^{INK4a} i c-Myc ⁵⁹.

En DLBCL són rellevants les translocacions cromosòmiques que impliquen el reordenament de la regió 3q27 i la conseqüent sobreexpressió del gen BCL6, augmentant al seu torn la taxa de proliferació cel·lular. També s'han trobat molts casos que presenten alteracions de dit gen per mutació però sense presència de translocació ^{66,82}. BCL6 reprimeix tot un conjunt de gens implicats en l'activació de les cèl·lules B i la seva diferenciació, així com d'altres implicats en cicle cel·lular (cyclina D2, p27^{KIP1}), i s'ha hipotetitzat que pot induir indirectament l'expressió de c-Myc. Per altra banda, l'augment d'expressió de BCL6 també podria provocar la repressió de gens implicats en apoptosi. A part d'aquesta desregulació, en DLBCL també es poden trobar alteracions de certs CKI, com és el cas de la pèrdua de p16^{INK4a}. A més s'ha vist que l'expressió de p27^{KIP1} en DLBCL es correlaciona amb mal pronòstic, i generalment l'expressió d'aquesta proteïna en limfomes és inversament proporcional a la taxa de proliferació. També és freqüent l'alteració de Rb i dels factors p53 i c-Myc ⁷⁸.

Desregulació del cicle cel·lular en MCL

Els MCL són el paradigma dels tipus de NHL amb alteracions en els mecanismes implicats en la proliferació cel·lular³⁷⁻⁴⁰. Es caracteritzen per la presència de la translocació t(11;14)(q13;q32), que es detecta a pràcticament tots els casos i que condueix a la sobreexpressió constitutiva de la proteïna ciclina D1 (CCND1). Aquesta alteració cromosòmica provoca la juxtaposició d'una regió del locus que codifica per la cadena pesada de les immunoglobulines (14q32) a una regió que codifica pel gen de la CCND1 (11q13). Aquest fet provoca que dit gen quedi sota la influència d'un *enhancer* de les immunoglobulines, produint-se'n l'expressió constitutiva (**Figura 9**)^{83,84}.

La CCND1 juga un paper clau en la progressió del cicle cel·lular durant la fase G₁ i la transició a la fase S, tot associant-se amb CDK4 i CDK6. Un augment de la seva expressió pot conduir a una acceleració del cicle i a un increment en les taxes de proliferació cel·lular a través de dos mecanismes bàsics: per una banda, aquest augment de concentració dels complexos ciclina D1-CDK4/6 porta a la fosforilació de Rb, el qual allibera determinats factors necessaris per la transcripció de gens implicats en la progressió del cicle. Per altra banda, aquest major nombre de complexos ciclina D1-CDK4/6 pot implicar el desplaçament dels CKI p27^{KIP1} i p21^{CIP1} dels complexos ciclina E/CDK2 (en els quals exerceixen una funció estabilitzadora). Això fa que els complexos ciclina E/CDK2 augmentin la seva activitat cinasa i hiperfosforilin, al seu torn, Rb. D'aquesta manera, la desregulació de l'expressió de CCND1 juga un paper molt important en la patogènesi dels MCL evitant els efectes inhibidors de Rb.

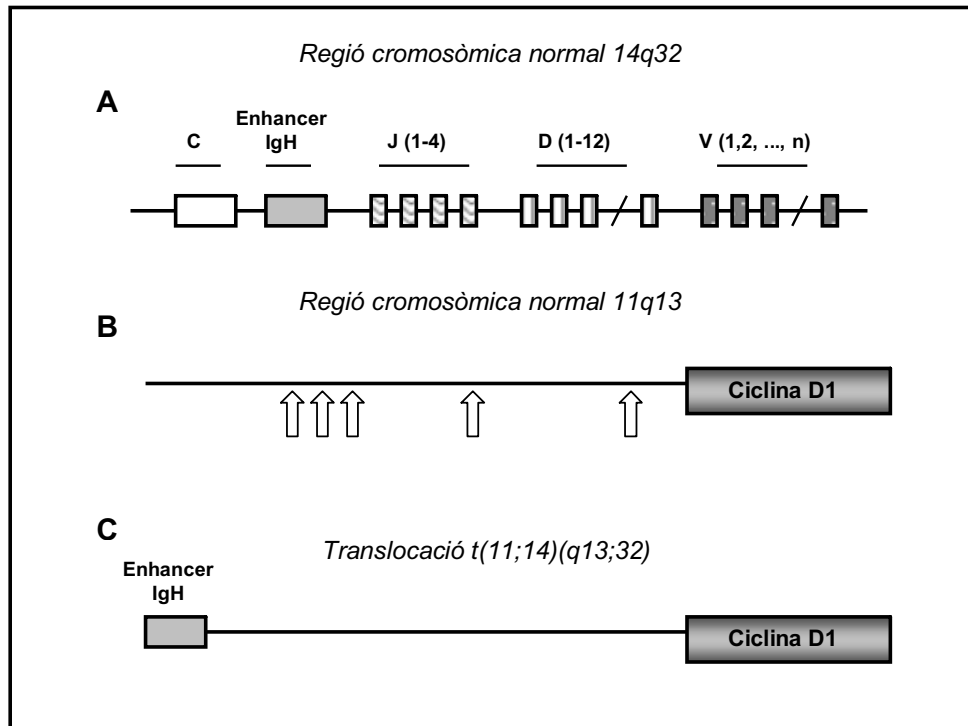


Figura 9: La translocació t(11;14)(q13;q32).

A. Locus normal de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgH) a 14q32, format per la regió constant (C), d'unió (J), de diversitat (D) i variable (V). B. Locus normal del gen de la ciclina D1 a 11q13. Les fletxes indiquen les zones de trencament més freqüents quan es dona la translocació. C. Translocació t(11;14)(q13;q32), per la qual el gen de la ciclina D1 passa a regular-se a través de l'enhancer de les IgH, provocant-se'n la sobreexpressió.

A part de la desregulació de CCND1 s'han trobat altres alteracions que poden afectar al cicle cel·lular en MCL i que contribueixen al desenvolupament del tumor (**Figura 10**). Aquest és el cas de la inactivació de p53, molt freqüent en els casos blàstics de MCL que tenen un alt índex proliferatiu i que s'associa a mal pronòstic⁸⁵⁻⁸⁷.

Pel que fa al gen MDM2 i com ja s'ha comentat, la seva sobreexpressió pot conduir a un augment de la proliferació cel·lular i desencadenar la progressió tumoral⁸⁸⁻⁹¹. Concretament s'ha observat que l'expressió de la proteïna MDM2 es relaciona amb una disminució de la supervivència en MCL⁸⁹. A més s'han trobat casos de MCL amb alts nivells d'expressió de mRNA del gen, que no necessàriament es relacionen amb guanys del seu locus genòmic^{88,91}.

També s'observen delecions del CKI p16^{INK4a}, fet que provoca que no s'inhibeixi la funció de CDK4 i CDK6. D'aquesta manera, la sobreexpressió de la CCND1 i la delecio de p16^{INK4a} cooperen en l'avanç del cicle cel·lular de les cèl·lules tumorals,

detectant-se delecions homozigotes d'aquest gen en una gran proporció de pacients amb MCL agressiu ^{92,93}. Per altra banda, i com ja s'ha comentat anteriorment, el locus que codifica per p16^{INK4a} (locus INK4a/ARF) també ho fa per un altre transcrit, p14^{ARF} (**Figura 8**). Les delecions del locus INK4a/ARF es troben en molts MCL, contribuint a un comportament més agressiu de la malaltia quan es combinen amb la inactivació de la via de p53 ^{94,95}. A més s'ha vist que certs casos presenten amplificació de BMI-1. Aquest gen actua com a repressor transcripcional del locus INK4a/ARF, i pot participar en la patogènesi dels MCL independentment de la presència de la delecio de INK4a/ARF, tot i que la seva amplificació i sobreexpressió es detecta en un petit grup de casos ⁹⁶.

Recentment s'ha observat que pacients amb MCL sense alteracions en el locus INK4a/ARF poden presentar amplificació i sobreexpressió de CDK4, especialment en un subgrup de casos molt agressius. Sembla ser que aquestes alteracions de CDK4 conjuntament amb les de les vies de p53 i MDM2 contribueixen a un pitjor pronòstic de la malaltia ⁸⁸. També s'han identificat delecions del gen Rb en casos de MCL altament proliferatius i sense alteracions del locus INK4a/ARF ⁹⁷. Aquest fet suggereix que les cèl·lules tumorals poden obtenir un avantatge selectiu mitjançant la inactivació de les dues vies ARF-MDM2-p53 i INK4a-CDK4-Rb ⁴¹.

Per altra banda, l'estudi de l'expressió gènica d'una gran quantitat de gens mitjançant les tècniques de microarrays ha permès identificar altres factors implicats en el cicle cel·lular i que estan alterats específicament en les variants més agressives de la malaltia, com és el cas de la sobreexpressió de la cinasa CKS1, que bloqueja la inhibició del complex ciclina D1/CDK4 a través de la seva acció sobre p27^{KIP1}; o la de CDC25B, que podria accelerar la transició del punt de control de la fase G₂/M ⁵⁸.

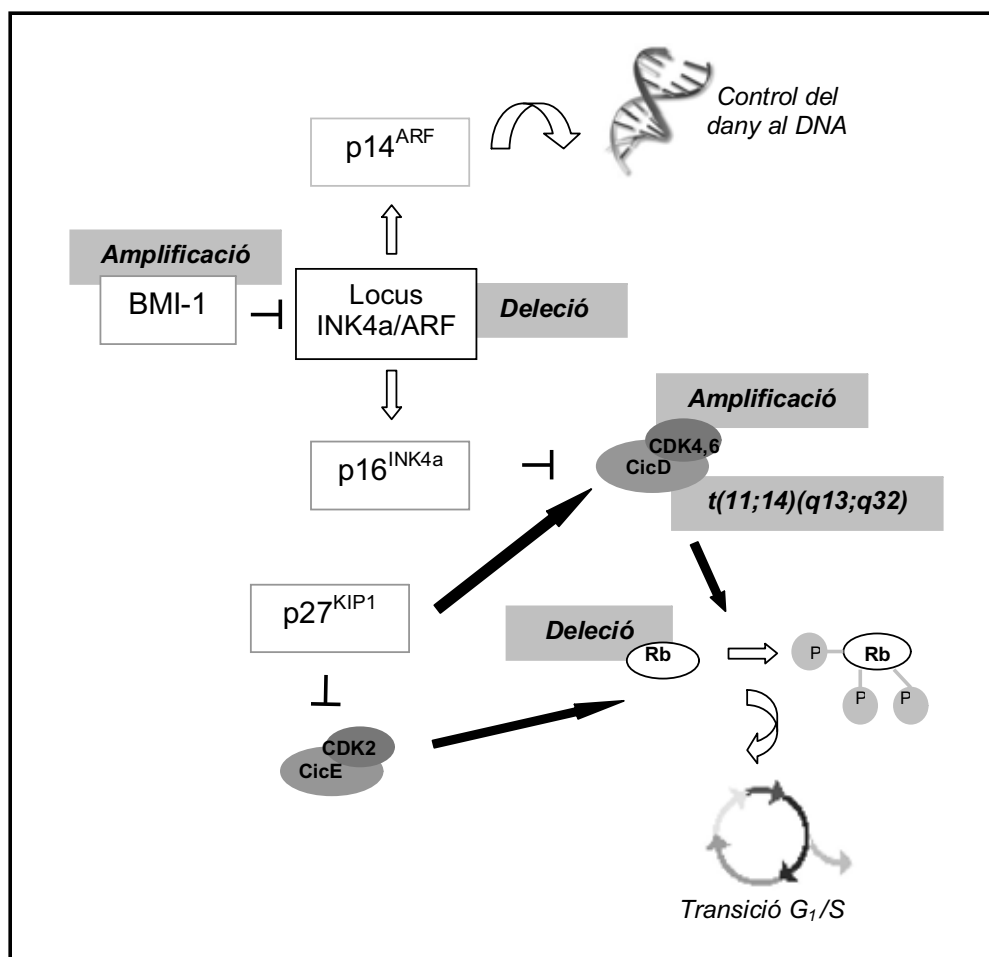


Figura 10: Desregulació del cicle cel·lular en MCL

La proliferació en MCL i els marcadors de supervivència

El MCL es va definir inicialment per ser un tipus de limfoma de comportament molt agressiu, amb una supervivència mitjana situada al voltant dels 3-4 anys i en què les teràpies actualment existents són poc eficients, ja que la gran majoria de pacients acaben recaient. S'han identificat dues variants citològiques de la malaltia amb diferents manifestacions clíniques i també pronòstiques: la **típica** i la **blastoïde**, agrupant-se aquesta última al seu torn en els subtipus blàstic i pleomòrfic, i amb una supervivència menor de 2 anys^{98,99}. A l'altra banda de l'espectre s'han identificat recentment el que semblen ser unes noves variants **leucemitzades** de la malaltia amb un curs més indolent i una supervivència més llarga, al voltant dels 6-10 anys, i que en principi no necessiten teràpia. Així doncs el MCL té un pronòstic més variable del que inicialment es pensava quan es va definir com a entitat independent dins dels NHL. Per aquesta raó s'han intentat descobrir diversos factors que permetin predir el curs clínic de la malaltia i estratificar-ne el risc, útils per investigar els mecanismes implicats

en la seva patologia i que permetin una millora en el diagnòstic i tractament dels pacients.

Com que els alts índexs proliferatius han estat una de les característiques principals dels MCL, des de fa anys es fa servir l'expressió del marcador **Ki67** per detectar les taxes de proliferació cel·lular mitjançant immunohistoquímica. Ki67 és un antigen nuclear que només s'expressa en cèl·lules que proliferen (fase G₁, S, G₂ i M) però no en cèl·lules en estat de repòs o quiescents (G₀). Recentment s'ha vist que es poden estratificar els pacients respecte el seu índex de Ki67 de manera quantitativa, podent-se aplicar aquest indicador en la presa de decisions terapèutiques, ja que alts valors de Ki67 s'associen amb mal pronòstic ^{81,100}. Un altre gen amb possible aplicabilitat en la rutina diagnòstica podria ser MCM6, el qual participa en la replicació del DNA i que sembla tenir un poder de predicció de la supervivència superior a Ki67 ¹⁰¹. Per altra banda s'ha observat que la duració de la fase G₁ és molt variable i que cèl·lules amb aquesta fase molt llarga poden tenir índexs Ki67, així com MCM6, més elevats, ja que ambdues proteïnes s'expressen durant G₁. Basats en aquest principi s'han cercat marcadors més específics de la proliferació cel·lular, trobant que Repp86, que també és una proteïna nuclear i que s'expressa durant les fases S, G₂ i M; pot esdevenir un factor pronòstic important de la malaltia ¹⁰². Tot i això, les tècniques immunohistoquímiques són semiquantitatives i, en un estudi multicèntric molt recent, s'ha vist que la concordança de les mesures pels diferents marcadors no era gaire bona degut a l'existència de variacions en el marcatge i la valoració de la mostra, fet especialment rellevant en el cas de l'índex Ki67 ¹⁰³.

El predictor de la supervivència dels pacients de MCL més important que s'ha trobat fins ara és el que es coneix com a **signatura de proliferació**, és a dir, un conjunt de gens que s'expressen coordinadament en associació amb un procés biològic concret; en aquest cas 20 gens relacionats amb l'augment de la proliferació i implicats en els processos de replicació del DNA, la progressió del cicle cel·lular i les demandes metabòliques que impliquen els mecanismes proliferatius: CDC2, ASPM, tubulina- α , CENP-F, RAN, CIP2, MCM2, la DNA polimerasa E2, CDC20, TFIIB, topoisomerasa II- α , PCNA, CEBPB i l'helicasa de DNA PIF1, entre d'altres ⁴⁸. Aquesta signatura, identificada mitjançant l'estudi dels perfils d'expressió d'una llarga sèrie de MCL, ha permès definir subgrups amb valor pronòstic en què la supervivència difereix en més de 5 anys. El model també ha millorat la capacitat de predicció dels models estadístics que interrelacionen alteracions oncogèniques individuals, com ara l'expressió de CCND1 i les delecions del locus INK4a/ARF; esdevenint un important integrador

quantitatiu de les diferents alteracions que es donen en les cèl·lules d'aquest tipus de limfoma. Tot i això el gran nombre de gens implicats en aquesta signatura dificulta la seva posterior aplicació en tècniques de rutina diagnòstica.

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

L'apoptosi o mort cel·lular programada

Les cèl·lules tenen un període de vida limitat, amb una duració que depèn del tipus cel·lular. La seva mort pot produir-se de forma traumàtica, per exemple, per l'acció d'agents citotòxics o infecciosos, procés que es denomina **necrosi**; o bé pot succeir per mecanismes programats i específics de la pròpia cèl·lula, fenomen anomenat **apoptosi**. L'apoptosi o mort cel·lular programada juga un paper fisiològic clau durant el desenvolupament embrionari i manteniment de la gran majoria dels teixits, a més de regular l'eliminació de cèl·lules potencialment perilloses per l'organisme, com ara les que han adquirit mutacions gèniques perjudicials o bé cèl·lules infectades per virus. Les alteracions de l'apoptosi poden donar lloc a diverses malalties, com ara certs desordres neurològics (Alzheimer, Parkinson i la malaltia de Huntington, entre d'altres) o càncer^{1,104}.

L'apoptosi es pot iniciar principalment a través de dues vies: la via **intrínseca**, que implica la participació del mitocondri, i la via **extrínseca**, a partir dels receptors de mort i senyals extracel·lulars. Ambdues vies interactuen i desencadenen l'activació de les **caspases** iniciadores, que són un tipus de proteases que tallen determinats substrats cel·lulars. Les caspases es troben en forma de proenzim en el context cel·lular, i necessiten ser tallades al seu torn per altres factors per poder dur a terme la seva funció. Les caspases iniciadores activades per la via intrínseca i extrínseca activen, al seu torn, les caspases executores, que són les que provoquen els canvis bioquímics i morfològics determinants i característics del procés apoptòtic^{105,106} (**Figura 11**).

La via intrínseca es pot desencadenar per diferents estímuls que provoquin estrès cel·lular, com ara la presència de radiacions ultraviolades o substàncies tòxiques que produeixin dany al DNA. Aquests estímuls provoquen l'alliberament del **citocrom C** i

d'altres factors apoptòtics de l'espai intermembranós del mitocondri. Al citosòl el citocrom C forma un complex anomenat **apoptosoma**, amb el factor APAF1, ATP i la procaspasa 9, mitjançant el qual s'activa una de les caspases iniciadores de l'apoptosi, la caspasa 9. Els gens pro- i anti-apoptòtics de la família BCL2 en regulen el procés.

La via extrínseca s'inicia a través de les **citoquines**, un grup de molècules senyalitzadores que pertanyen a la família del TNF (de l'anglès *Tumor Necrosis Factor*). Les citoquines s'uneixen als seus receptors específics, que es caracteritzen per tenir un domini extracel·lular d'unió al lligand ric en cisteïnes i un **domini de mort** al seu extrem citoplasmàtic, a través del qual medien la seva funció apoptòtica. L'activació dels receptors de mort els provoca un canvi conformacional i la unió de complexos de senyalització al seu domini intracel·lular a través de la proteïna adaptadora FADD. FADD atreu les formes inactives de dues caspases iniciadores, les caspases 8 i 10, que s'associen al seu torn dins del complex senyalitzador inductor de mort o **DISC** (de l'anglès *Death-Inducing Signalling Complex*). Al DISC s'activen ambdues caspases i es desencadena el procés apoptòtic.

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

Com s'ha comentat a la primera part d'aquesta introducció, dins del centre germinal del fol·licle limfoide secundari es dona la transició de les cèl·lules B madures verges a cèl·lules B madures efectores en trobar-se amb un antígen determinat. Aquesta maduració limfocitària implica que succeeixin tot un seguit d'esdeveniments genètics, com ara la hipermutació del gen de les immunoglobulines i el seu canvi de classe, per tal d'obtenir limfòcits altament afins i específics per l'antigen. Aquests processos estan regulats de forma molt estricta per assegurar la supervivència únicament de les cèl·lules correctament desenvolupades, eliminant-se del sistema les que tenen aberracions genètiques i les que esdevenen autoreactives. Així doncs, els punts de control de l'apoptosi juguen un paper clau en el cicle vital dels limfòcits ¹⁰⁷.

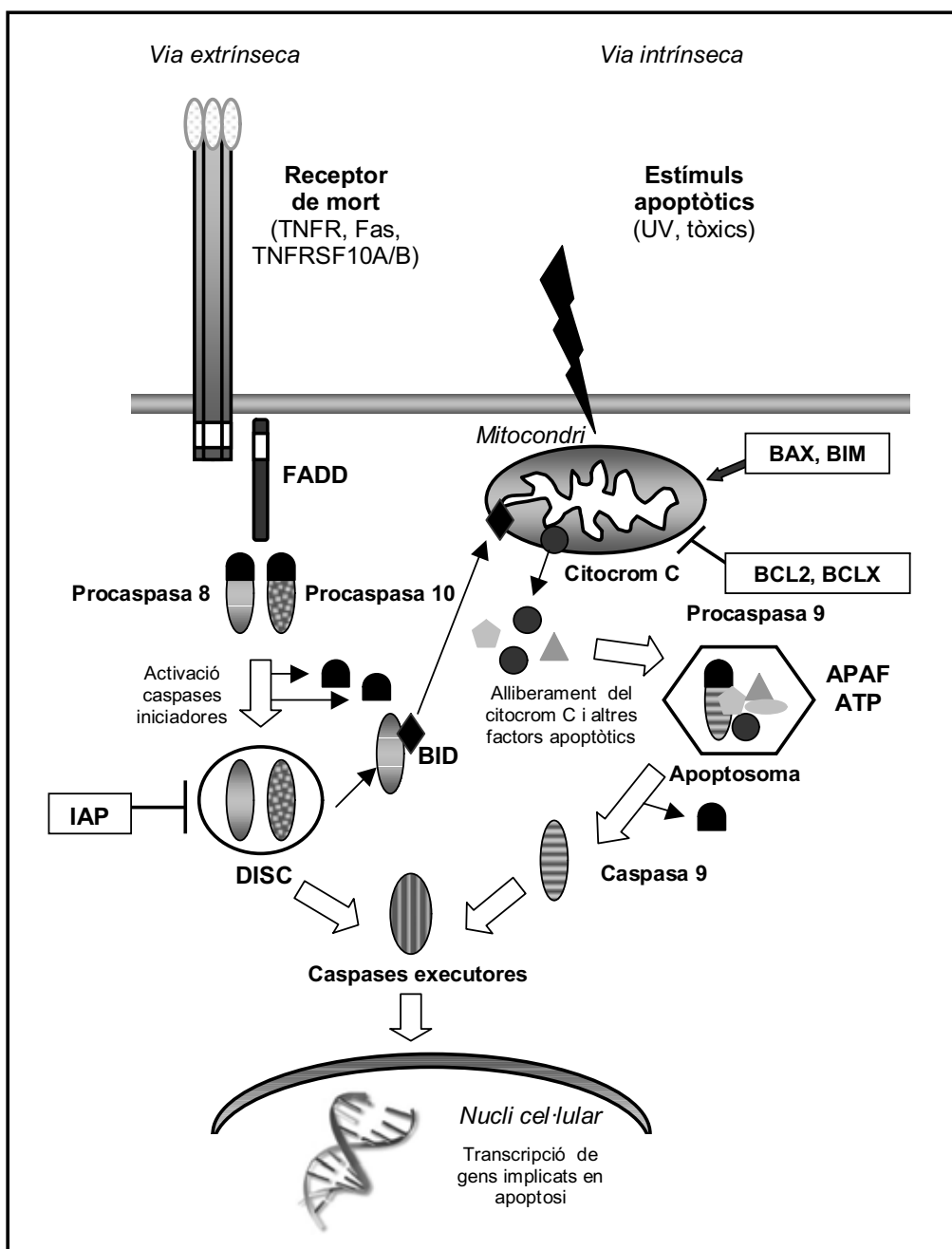


Figura 11: L'apoptosi: integració de la via intrínseca i extrínseca

El primer punt de control implica la participació de la via extrínseca i dels seus receptors de mort, ja que les cèl·lules del centre germinal són sensibles a l'apoptosi mediada per FasL sota determinades condicions (activació de l'antigen CD40 de la superfície dels limfòcits B i interacció amb l'antigen CD154 de la superfície dels limfòcits T circulants), que és rellevant en l'eliminació de cèl·lules B autoreactives. El segon punt de control apoptòtic es dona a través de la via intrínseca. La selecció

positiva i supervivència de les cèl·lules B específiques per un antigen determinat necessita l'activació del receptor de cèl·lules B (BCR, de l'anglès *B-Cell Receptor*), l'estimulació a través de citoquines inflammatòries i la co-estimulació dels complexos CD19/CD21 i CD40/CD154. La integració d'aquest conjunt d'estímuls provoca l'activació de les proteïnes anti-apoptòtiques de la família BCL2, estabilitzant-se la membrana mitocondrial i evitant la mort cel·lular programada perquè no s'allibera el citocrom C. D'aquesta manera alteracions en els mecanismes i punts de control apoptòtics del centre germinal, tant pel que fa a la via extrínseca com a la intrínseca, poden contribuir al desenvolupament de diversos tipus de limfomes.

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

Així com s'esdevé en altres tipus de càncers humans, un desequilibri entre les vies d'apoptosi i supervivència cel·lulars pot ser crític pel desenvolupament d'un limfoma. L'existència de defectes en la maquinària apoptòtica és especialment rellevant per la patogènesi de certs tipus de NHL, com és el cas de les CLL i els FL ^{78,108,109}.

En el cas de la CLL l'apoptosi sembla ser la causa principal d'acumulació de cèl·lules tumorals. Les alteracions genètiques i/o del microambient cel·lular que afectin aquest mecanisme poden promoure l'expansió dels limfòcits sense necessitat d'accelerar les taxes de proliferació. Aquest fet implica l'acumulació lenta i gradual de les cèl·lules B alterades, circumstància que probablement explica perquè aquest desordre limfoproliferatiu és de natura crònica enlloc d'aguda. Damunt d'aquesta base de mort cel·lular programada descontrolada poden afegir-se alteracions que afectin el cicle cel·lular, contribuïnt a l'evolució d'aquest tipus de leucèmia a una variant més agressiva de la malaltia, com ara el RS. Els defectes de les vies d'apoptosi en CLL es poden produir per una gran varietat de mecanismes. Dins de la via intrínseca es pot donar la sobreexpressió de proteïnes antiapoptòtiques reguladores de la família BCL2 i/o i de la família de les IAPs, que inhibeixen l'activitat de les caspases (**Figura 11**). Els receptors de mort implicats en la via intrínseca també poden patir alteracions, com s'ha observat en els receptors de FasL i TRAIL; ja sigui per deleció gènica del gen, l'adquisició de mutacions inactivadores o canvis de la seva expressió. Per últim, també s'ha vist que diversos tipus de citoquines, interferons i factors angiogènics juguen un paper clau en la desregulació de l'apoptosi en aquest tipus de NHL, aportant senyals

de supervivència o bé contrarrestant els processos de mort cel·lular de la població de cèl·lules tumorals ^{108,110}.

Els FL, de forma similar a les CLL, es desenvolupen principalment per l'acumulació passiva de cèl·lules que no moren de manera apropiada. Excepte algun subtipus molt específic, aquesta entitat clínica presenta típicament la translocació t(14;18)(q32;q21), que provoca l'expressió constitutiva de la proteïna BCL2. Aquesta proteïna és plenament funcional i suficient per evitar la mort de les cèl·lules tumorals. També s'ha observat que en certs casos l'apoptosi pot inhibir-se per altres mecanismes alternatius, com ara per la sobreexpressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bax i Bcl-X(L); i per un possible augment de l'activació de la via Akt/BAD ¹¹¹.

Els MCL es caracteritzen per ser un tipus de limfoma molt agressiu en què destaca una proliferació cel·lular altament descontrolada. Tot i això també s'han trobat alteracions en les vies apoptòtiques que podrien contribuir a la seva patogènesi. Aquest és el cas de la proteïna BCL2 i altres membres de la seva família antiapoptòtica, que es troben sobreexpressats. A més s'ha vist que l'expressió alterada de certes molècules reguladores de les caspases i altres factors mediadors del senyal transmès pels receptors de mort, com ara FADD, poden afectar l'apoptosi d'aquest tipus de limfoma ¹¹². En un estudi recent d'expressió gènica s'han identificat tot un grup de gens implicats en apoptosi especialment desregulats en MCL, destacant la sobreexpressió de BCL2 i TOSO (implicat en l'apoptosi mediada per Fas), així com la de gens relacionats amb el factor TNF i les vies de NFκβ ¹¹³. Així mateix s'ha vist que la via de supervivència de Akt, que és una cinasa encarregada de traduir senyals extracel·lulars que regulen diversos processos cel·lulars com el cicle cel·lular i l'apoptosi; està activada en MCL ¹¹⁴. El conjunt d'aquestes observacions sembla indicar que l'alteració de les vies apoptòtiques pot tenir un paper més important del que inicialment es pensava en el desenvolupament dels MCL, fet que pot explicar en part la poca resposta d'aquests tumors a les estratègies terapèutiques que s'apliquen en l'actualitat.

El DLBCL és una malaltia en què es troben alterades diverses vies de senyalització cel·lular. Pel que fa a l'apoptosi, la sobreexpressió de BCL2 s'ha associat a pitjor pronòstic, presentant-se la t(14;18)(q32;q21) en el 20-30% dels casos. A més determinats subtipus de DLBCL tenen activació constitutiva de la via de NF-κβ, provocant-se l'augment de l'expressió de diversos factors antiapoptòtics. Aquest és el cas de les proteïnes c-FLIP (que inhibeix FLICE, proteïna que participa en la via de

senyalització dels receptors de mort); i la survivina, que pertany a la família de les proteïnes IAPs ¹¹⁵.

Els receptors de mort i l'apoptosi lligada a TRAIL

Els receptors de mort implicats en la via extrínseca del procés apoptòtic són proteïnes que pertanyen a la família del TNF, dins de la qual es troben els receptors de les citoquines TNF, limfotoxina α , lligand de Fas (FasL), Apo3L i el lligand inductor d'apoptosi relacionat amb TNF (TRAIL, de l'anglès *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*), entre d'altres.

El gen de la citoquina **TRAIL** es localitza a la regió cromosòmica de 3q26 i codifica per una proteïna transmembrana de tipus II altament homòloga a FasL que forma trímers, tot i que una petita part també pot produir-se en forma soluble ¹¹⁶. TRAIL és una molècula particularment interessant perquè s'ha observat que induïx l'apoptosi selectivament en cèl·lules tumorals o transformades però no en cèl·lules normals, podent tenir una important aplicació terapèutica. A més s'expressa constitutivament en una gran varietat de teixits, a diferència d'altres citoquines de la mateixa família. Aquest fet implicaria una regulació de l'apoptosi mediada per TRAIL bàsicament a partir de la distribució i disponibilitat dels seus receptors. Tot i això, sembla ser que aquest procés és molt més complex del que inicialment es pensava, amb el descobriment i caracterització de cinc receptors diferents: TNFRSF10A/TRAIL-R1/DR4, TNFRSF10B/TRAIL-R2/DR5, TNFRSF10C/TRAIL-R3/DcR1, TNFRSF10D/TRAIL-R4/DcR2 i OPG (**Figura 12**) ¹¹⁶⁻¹¹⁸. Els quatre primers es localitzen a la regió cromosòmica 8p21, molt pròxims entre ells, suggerint una possible evolució a partir d'un precursor comú i a través de diversos processos de duplicació posteriors. Per altra banda, el receptor OPG també es localitza al cromosoma 8, però a la regió q23-24. Dels cinc receptors de TRAIL que s'han identificat fins a l'actualitat, només TNFRSF10A i TNFRSF10B són capaços de mediar els processos de mort cel·lular programada, mentre que TNFRSF10C i TNFRSF10D l'antagonitzen perquè manquen del domini de mort o bé el tenen truncat, respectivament. OPG, en canvi, és un receptor secretat que participa en la reabsorció òssia i sembla actuar en altres tipus de processos cel·lulars.

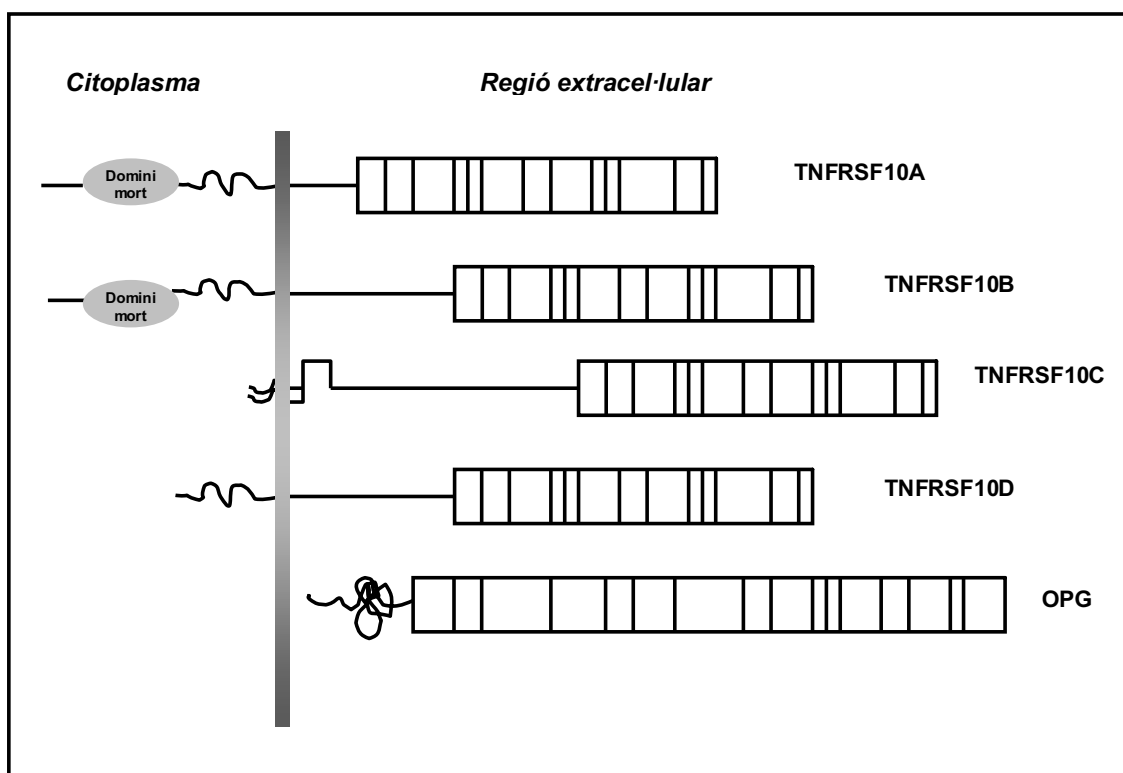


Figura 12: L'estructura dels receptors de TRAIL.

Les línies verticals dins dels dominis extracel·lulars representen les zones riques en cisteïnes.

TNFRSF10A i TNFRSF10B presenten una estructura molt similar, ja que tots dos són proteïnes transmembrana de tipus I amb un domini extracel·lular ric en cisteïnes i homòleg al que posseeixen altres membres de la família de receptors de TNF. La part intracel·lular presenta el domini de mort característic a partir del qual es media l'apoptosi, i que també és altament homòleg als dominis de mort de Fas i TNFR-1. TNFRSF10A va ser el primer receptor de TRAIL que es va identificar, i presenta una homologia del 58% amb TNFRSF10B, especialment en el domini de mort. Pel que fa a TNFRSF10B, aquest presenta dos trànscrips alternatius: DR5A/TRICK2A (curt) i DR5B/TRICK2B (llarg), que difereixen en el nombre d'aminoàcids del segment comprès entre el domini extracel·lular ric en cisteïnes i la regió transmembrana (**Figura 12**). Ambdues formes semblen tenir la mateixa funció, assemblant-se més DR5A/TRICK2A a TNFRSF10A. Tant TNFRSF10A com TNFRSF10B tenen un patró d'expressió ampli i parcialment coincident, podent-se produir l'apoptosi igualment en cas de què un dels receptors fallés.

La unió de TRAIL a aquests receptors provoca la seva activació i l'associació de molècules adaptadores al seu extrem citoplasmàtic, com ara FADD, TRADD i RIP. Així es desencadena una via de senyalització molt similar a la de Fas, que conduirà a l'activació de les caspases iniciadores del procés apoptòtic (**Figura 13**)¹¹⁹. Per altra banda s'activa la via de NF- κ B i c-Jun a partir de la interacció amb TRADD, regulant-se la transcripció de diferents gens que participen en diversos processos cel·lulars¹¹⁶.

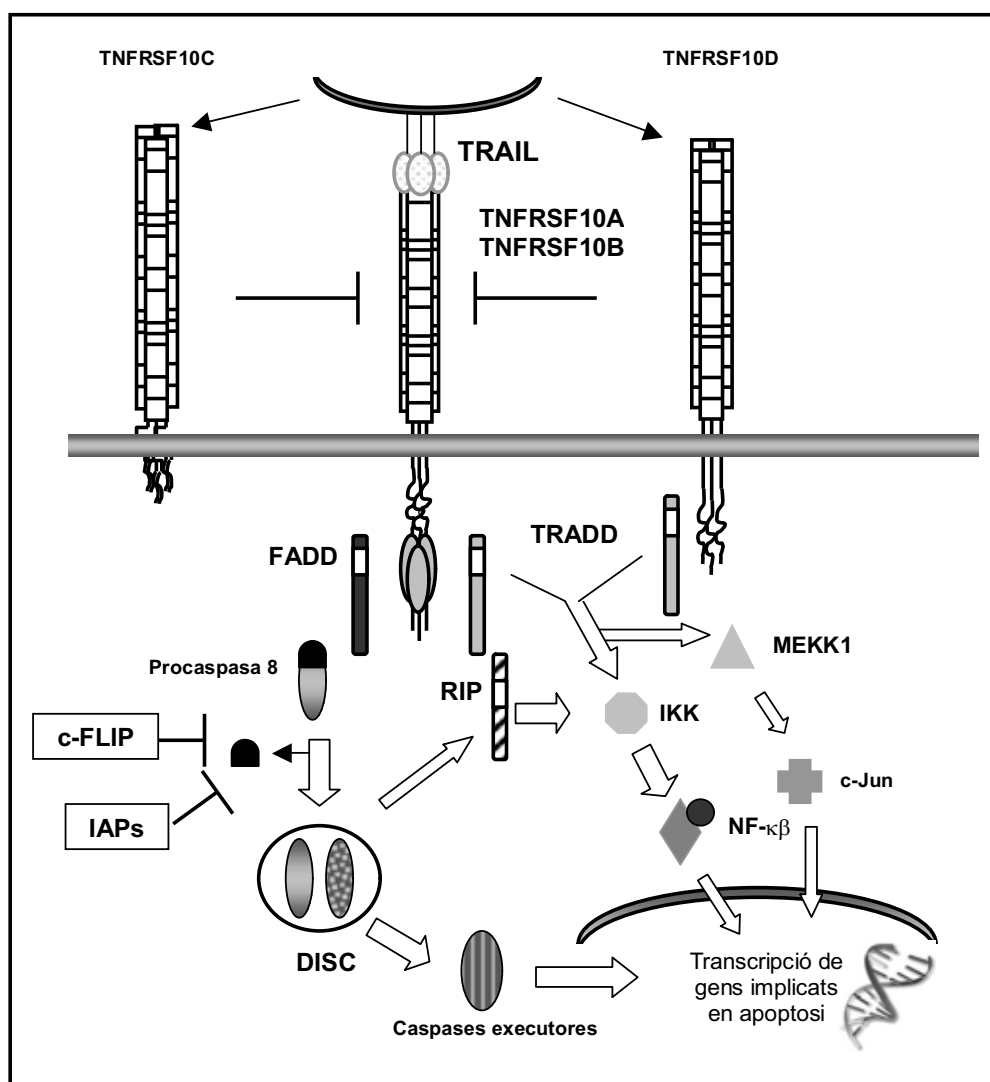


Figura 13: La senyalització apoptòtica mediada per TRAIL

La senyalització mediada per TNFRSF10A i TNFRSF10B està altament regulada a diferents nivells. Sembla ser que la presència dels receptors TNFRSF10C i TNFRSF10D és capaç d'antagonitzar l'apoptosi induïda per TRAIL. L'expressió de TNFRSF10C està restringida, trobant-se especialment en els limfòcits de sang perifèrica; mentre que TNFRSF10D s'expressa més àmpliament. Alguns estudis han

observat que ambdós receptors defectius s'expressen només a cèl·lules normals, explicant-se d'aquesta manera perquè TRAIL pot induir l'apoptosi en cèl·lules tumorals o transformades però no en cèl·lules normals. La inhibició de l'apoptosi a partir d'aquests receptors es podria dur a terme a través de quatre hipotètics mecanismes bàsics: per la competició de TNFRSF10C i TNFRSF10D amb TNFRSF10A i TNFRSF10B per la unió al lligand, la formació d'heterocomplexos inactius dels dos receptors de mort i dels dos receptors defectius, per la senyalització antiapoptòtica produïda a través de TNFRSF10D; o bé per la formació d'heterocomplexos a partir del domini extracel·lular que impedeixin la unió a TRAIL ¹¹⁶.

Existeixen altres factors implicats en la regulació del senyal apoptòtic produït pels receptors de mort de TRAIL, com ara l'activació de p53 provocada per la presència de dany al DNA, que indueix un augment de l'expressió de TNFRSF10B ¹²⁰. A més determinades proteïnes de la família de les c-FLIPs i les IAPs bloquegen l'apoptosi mediada per TRAIL en resposta a estímuls molt determinats. També s'ha observat que TNFRSF10A i TNFRSF10B poden interactuar entre ells i formar heterocomplexos amb diferents afinitats per TRAIL, acomplint funcions cel·lulars també diferents i demostrant l'existència d'un balanç dinàmic entre ambdós receptors ^{117,118}.

Les alteracions dels receptors de TRAIL i càncer

Tal com s'esdevé amb el FasL, els receptors de TRAIL també participen en la regulació del creixement de les poblacions de limfòcits B, jugant un paper essencial en el manteniment del sistema immunitari. La disminució de la funció o bé la inactivació d'aquests receptors podria interferir amb els mecanismes de supervivència cel·lular i facilitar l'acumulació de cèl·lules B tumorals, permetent el desenvolupament d'una neoplàsia limfoide. Aquesta alteració funcional es pot produir principalment per la pèrdua al·lèlica del gen i/o canvis de la seva expressió gènica, així com per l'adquisició de certes mutacions somàtiques. En el cas d'alguns NHL com MCL i CLL, s'ha vist que és molt freqüent la pèrdua de la regió cromosòmica 8p21-22, suggerint la localització de possibles gens supressors de tumors la pèrdua dels quals contribueix al desenvolupament de la malaltia. Aquesta és precisament la zona on se situen els receptors de TNFRSF10A i TNFRSF10B, podent-se associar la seva carència amb la progressió clínica i la transformació cel·lular en CLL, i també amb el desenvolupament de variants més leucemitzades de MCL ^{34,40,46,107,121-123}. S'ha observat en experiments *in vitro* que les cèl·lules de CLL no són sensibles a la mort mediada per TRAIL, podent

estar-hi implicades en aquesta resistència alteracions en ambdós receptors de mort o en les vies de senyalització que medien ¹²⁴. Per altra banda, un estudi molt recent de diverses línies cel·lulars de MCL ha demostrat que la seva sensibilitat a TRAIL no depèn de l'expressió dels seus receptors ni de la pèrdua de la regió cromosòmica de 8p21-22. D'aquesta manera els defectes de senyalització apoptòtica a través d'aquesta via podrien ésser deguts a alteracions de les molècules que actuen després de la interacció del lligand amb el receptor, com ara c-FLIP ¹²⁵.

Pel que fa a l'existència de mutacions somàtiques que puguin afectar TNFRSF10A i TNFRSF10B, se n'han trobat en una gran varietat de càncers, com ara carcinomes gàstrics, de cap i coll, i mama entre d'altres, tot i que semblen ser rares en NHL. La majoria d'aquestes mutacions es detecten en el domini de mort del receptor i en zones intròniques; essent les més freqüents les que impliquen un canvi de nucleòtid. Les mutacions en ambdós gens tenen una funcionalitat pràcticament desconeguda, tot i que s'hipotetitza que poden afectar l'eficiència de transmissió de senyals apoptòtics a través dels receptors ¹²⁶⁻¹³¹.

A més de la possibilitat d'adquirir mutacions, certs polimorfismes en regions reguladores o funcionals dels receptors de TRAIL s'han associat amb diferents tipus de tumors humans ¹³¹⁻¹³⁶. Aquest és el cas del polimorfisme A1322G al domini de mort de TNFRSF10A, que sembla fer el receptor menys sensible a l'activació per TRAIL mitjançant un efecte de dominant negatiu ^{131,134}. Al domini d'unió a lligand d'aquest mateix receptor es troben els polimorfismes G422A i C626G, els quals s'associen en homozigosi amb un major risc d'aparició de determinats tumors sòlids, com ara els de pulmó, gàstrics i de cap i coll, tot i que la seva funcionalitat encara no ha estat comprovada ¹³². Per altra banda, a través d'estudis epidemiològics s'ha vist que C626G sembla tenir un efecte protector en pacients amb càncer de bufeta ¹³³. Recentment s'ha detectat l'existència del polimorfisme A683C, el qual se situa també en una regió pròxima d'unió a lligand i que sembla associar-se a càncer de pròstata, bufeta, cap i coll i certs tipus de NHL, com ara CLL i MCL ¹³⁶.

A més dels mecanismes esmentats que poden alterar la funcionalitat dels receptors i el seu paper en la regulació de l'apoptosi mediada per TRAIL, també s'ha descobert que la senyalització a través de TNFRSF10A i TNFRSF10B pot variar depenent del tipus de càncer estudiat. Aquest és el cas de determinats NHL, com ara la CLL, en què sembla que l'acció de TRAIL es media essencialment a través de TNFRSF10A ^{137,138}. Això podria explicar la diferent sensibilitat a TRAIL de certs tumors humans, afegint

complexitat al sistema i al seu paper en el desenvolupament de les neoplàsies limfoides.

Anàlisi global dels mecanismes implicats en la patogènesi dels NHL:

Estudi de la progressió de la Leucèmia Limfàtica Crònica

Alguns tipus de limfomes són capaços de progressar de formes més indolents a variants més agressives durant el transcurs de la malaltia^{139,140}. El terme **progressió** es fa servir per designar el conjunt de canvis clínics, morfològics i biològics que experimenta el tumor d'un pacient. Aquests canvis poden conduir a l'augment de la massa tumoral i a l'agreujament de símptomes de la malaltia; i en molts casos impliquen la transició d'una variant histològica, normalment de baix grau, a una altra d'alt grau, com ja s'ha vist en l'apartat anterior en referència a la descripció dels diferents tipus de NHL estudiats en el present treball.

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

Es considera que la CLL és el tipus de leucèmia més freqüent dels països occidentals. En la gran majoria de casos, la malaltia segueix un curs bastant indolent i asimptomàtic que no requereix tractament. La supervivència es mesura per mesos i anys, i normalment els pacients moren per causes secundàries que no tenen relació amb la leucèmia. De totes maneres, últimament s'ha observat que la clínica de les CLL podria ser més heterogènia del que inicialment s'havia pensat, ja que alguns pacients desenvolupen de cop i volta signes i símptomes de progressió tumoral de pitjor pronòstic, encara que aquests casos no es diferenciïn histològicament de les CLL amb un comportament més típic. Els tractaments existents a l'actualitat són capaços d'induir remissions, però virtualment tots els casos acaben recaient a la llarga. Avui dia s'està fent un gran esforç per descobrir les causes biològiques que condueixen a aquest canvi del comportament clínic dels pacients, per tal de millorar-ne el diagnòstic i el tractament^{141,142}.

Precisament aquesta variabilitat existent en el curs clínic de les CLL va fer que inicialment es desenvolupessin dos sistemes de classificació i estratificació de la malaltia que permetessin preveure'n el risc i pendre desicions terapèutiques, coneguts com els sistemes de **Rai** i **Binet**. El sistema de Rai inclou paràmetres com la

limfadenopatia (engrandiment dels ganglis limfàtics), l'esplenomegàlia (engrandiment de la melsa), i la presència d'anèmia (disminució del nombre d'eritròcits, de la quantitat d'hemoglobina o del valor de l'hematòcrit) i trombocitopènia (disminució del nombre de plaquetes), establint un seguit d'estadis del 0 al 4. La classificació de Binet està més simplificada i sobretot es refereix a la limfadenopatia i la presència d'anèmia o trombocitopènia, determinant els estadis d'A a C (**Taula 2**)¹⁴³⁻¹⁴⁵.

Taula 2: Estadiatge al diagnòstic de CLL pels sistemes de classificació de Rai i Binet

I. Sistema de Rai¹⁴³

0. Augment del nombre de limfòcits en sang (limfocitosi)
1. Engrandiment dels ganglis limfàtics (limfadenopatia)
2. Engrandiment de la melsa (esplenomegàlia)
3. Hemoglobina < 11 g/dl
4. Plaquetes < 100.000/ μ l

II. Sistema de Binet¹⁴⁴

- A. Augment del nombre de limfòcits en sang (limfocitosi)
 - B. Engrandiment dels ganglis limfàtics (limfadenopatia) en > 3 àrees
 - C. Citopènia: hemoglobina < 10g/dl o plaquetes < 100.000/ μ l
-

Combinant els dos sistemes de classificació els pacients que es troben a l'estadi més avançat de la malaltia tenen una supervivència mitjana d'entre 1 i 2 anys, mentre que els pacients en els primers estadis poden viure més de 10 anys. Tot i això molts cops no es pot predir el curs clínic dels casos amb presició, i els mecanismes cel·lulars que condueixen a la progressió d'aquesta síndrome limfoproliferativa continuen essent poc clars.

Factors pronòstics en la progressió de la CLL

L'aplicació de les tècniques de biologia molecular al camp de la patologia i la biomedicina en general ha permès entendre millor els fenòmens implicats en l'evolució de la CLL. Així s'han pogut identificar diversos marcadors que semblen associar-se amb les formes agressives de la malaltia i que són independents de les

característiques clíniques del pacient ^{142,146,147}. Entre aquests factors pronòstics trobem els següents (**Taula 3**):

- 1. Alteracions citogenètiques:** es considera que la presència d'alteracions genètiques a les regions de 17p, 11q i la trisomia del cromosoma 12 s'associa amb mal pronòstic en CLL. Específicament la deleció de 17p i 11q22-q23 podria implicar la pèrdua dels corresponents gens supressors de tumors p53 i ATM, fet que s'ha associat a la progressió de la malaltia i a la disminució de la supervivència dels pacients ^{20,21,29}. A més, tot i que la majoria dels casos semblen tenir un cariotip estable durant el curs de la leucèmia, algunes alteracions cromosòmiques es poden adquirir durant el seu desenvolupament i tenir un paper en el pronòstic, com ara la deleció de 13q14 i la trisomia del cromosoma 12 ^{29,34,148-151}.
- 2. Temps de duplicació dels limfòcits:** els pacients amb el temps de duplicació del recompte limfocitari absolut en sang perifèrica de menys de 12 mesos tenen pitjor pronòstic i menor supervivència ¹⁵².
- 3. Nivells de marcadors en sèrum: β 2-microglobulina (B2M), timidinat cinasa (TK) i CD23 soluble (sCD23):** la B2M és una proteïna de baix pes molecular associada amb el complex immunitari HLA, mentre que la TK és un enzim cel·lular implicat en certes vies de síntesi del DNA. El CD23 soluble és un receptor de baixa afinitat de les immunoglobulines de classe E, que funciona com un factor de creixement clau per l'activació de les cèl·lules B. Elevats nivells d'aquestes proteïnes en sèrum semblen ser factors de risc a patir una variant agressiva de la malaltia. S'ha vist que la B2M és un marcador molt potent de l'estadi clínic de les CLL. L'activitat de la TK sembla correlacionar-se amb l'activitat proliferativa de les cèl·lules de CLL i prediu la tendència a la progressió de la malaltia. Per altra banda, nivells elevats de sCD23 també s'han lligat a mal pronòstic i un temps de duplicació dels limfòcits ràpid. El principal desavantatge de fer servir aquests marcadors és que els seus límits de detecció poden variar depenent del laboratori en què s'estudien ^{153,154}.
- 4. Expressió de BCL2:** BCL2 és una proteïna mitocondrial implicada en la regulació dels processos de mort cel·lular programada, tenint una funció antiapoptòtica. Els reordenaments d'aquest gen i les alteracions a la regió cromosòmica on es localitza, 18q21, són molt poc freqüents en CLL. Tot i això

s'ha observat que alguns casos presenten nivells elevats d'aquesta proteïna i que aquest fet s'associa a un pitjor pronòstic ¹⁵⁵.

- 5. Expressió de CD38:** CD38 és un dels marcadors cel·lulars utilitzat per identificar i diferenciar els subtipus de limfòcits B durant els diversos estadis de desenvolupament i maduració. L'expressió de CD38 en $\geq 30\%$ de limfòcits es considera un factor de mal pronòstic, que sembla relacionar-se amb l'absència de mutacions en la regió del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines ²⁴.

- 6. Estat mutacional dels gens de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgV_H) i expressió de ZAP-70:** en els últims anys els pacients de CLL s'han dividit en dos grups en funció de la presència de mutacions en els IgV_H. Aquest fet reflexa el pas del limfòcit pel centre germinal, la trobada amb l'antigen i la realització dels processos d'hipermutació somàtica. Els casos sense mutacions en aquests gens tenen un curs clínic pitjor ^{23,151}. L'anàlisi i comparació posteriors dels perfils d'expressió gènica entre casos de CLL mutats i no mutats va permetre el descobriment i identificació de ZAP-70, una cinasa específica pel receptor de cèl·lules T, com el gen més diferencialment expressat entre els dos subgrups ^{150,156}. Posteriorment s'ha vist que existeix una correlació entre alts nivells de la proteïna ($\geq 20\%$ dels limfòcits), l'absència de mutacions en els IgV_H i agressivitat, esdevenint un factor pronòstic molt important de la progressió d'aquest tipus de leucèmia ^{32,157}.

- 7. Anàlisi dels perfils d'expressió dels microRNAs:** els microRNAs són petits RNAs no codificants de ~19-25 nucleòtids, que participen regulant la transcripció de determinats gens en una gran diversitat d'organismes. S'ha vist que gairebé el 50% dels microRNAs coneguts es localitzen en zones del genoma associades a càncer, suggerint un rol en la patogènesi de diferents tumors humans. Concretament un estudi dels perfils d'expressió de diferents microRNAs n'ha identificat 13 associats al pronòstic i progressió en CLL, diferenciant entre casos amb absència o presència de mutacions de IgV_H, i alta o baixa expressió de ZAP-70. D'aquesta manera els microRNAs podrien jugar un paper molt més important del que inicialment es pensava en la patogènesi d'aquest tipus de leucèmia ¹⁵⁸.

Diversos estudis han identificat altres factors que podrien ser susceptibles d'utilitzar-se com a marcadors de pronòstic en CLL, però que requereixen una validació dels resultats en grups més grans de pacients. Aquest és el cas de la detecció dels nivells de determinats marcadors en sèrum (VEGF, CD20, CD49d, trombopoietina), la mesura de la llargada dels telòmers i l'activitat telomerasa a les cèl·lules tumorals; o l'expressió gènica de certs gens (MCL-1, AID, LPL, ADAM29, CLLU1), entre d'altres ¹⁴⁶.

Probablement la integració de diferents factors de mal pronòstic, com per exemple l'expressió de CD38, l'estat mutacional dels IgV_H i/o l'expressió de ZAP-70, impliquen canvis a nivell de l'estimulació antigènica del BCR, alterant la interacció de les cèl·lules amb el microambient i contribuint a la supervivència dels limfòcits neoplàsics ^{14,20}. De fet un estudi molt recent aporta evidències que indiquen que la capacitat de respondre a l'estimulació del BCR juga un paper important en la supervivència, activació i progressió del cicle cel·lular en els pacients de CLL, associant-se a casos que presenten progressió i pitjor pronòstic ¹⁵⁹.

Per altra banda l'aparició de la tècnica dels microarrays, mitjançant els quals s'analitza l'expressió gènica de milers de gens al mateix temps en una mostra determinada, ha permès identificar nous factors que poden estar implicats en la patologia de la CLL i aportar coneixements sobre la seva cèl·lula postulada d'origen, determinant els perfils d'expressió gènica típics d'aquest tipus de leucèmia, com ja s'ha comentat anteriorment ^{22,160-163}.

Taula 3: Resum dels principals factors de bon i mal pronòstic en CLL

<i>Factors</i>	<i>Bon pronòstic</i>	<i>Mal pronòstic</i>
Alteracions citogenètiques	del13q14	del17p, del11q, trisomia 12
Temps de duplicació limfòcits	>12 mesos	≤ 12 mesos
Marcadors en sèrum	baixa	alta
BCL2	baixa	alta
CD38	baixa	alta (≥30%)
Mutacions IgV _H	mutat	no mutat
ZAP-70	baixa	alta (≥20%)
microRNAs	normal	alteració miR-15a, 16-1