

**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**

No s'ha de perdre mai la curiositat per seguir descobrint,  
perquè en ella radica la única font certa de felicitat. (*Eduard Punset*)

---

## APÈNDIX



## GLOSSARI

**Agressiu:** tipus de tumor caracteritzat per un alt índex proliferatiu, augment de la disseminació cel·lular i pitjor pronòstic; en què els signes i símptomes s'intensifiquen de forma brusca.

**Algorisme:** procediment de càlcul de dades que consisteix a acomplir un seguit d'instruccions matemàtiques ordenades per arribar a la solució del problema.

**Al·lel:** variant que pot presentar un gen determinat, i que pot implicar l'expressió diferencial d'un caràcter.

**Aminoàcid:** molècula orgànica que té almenys un grup funcional carboxil (-COOH) i un grup funcional amino (-NH<sub>2</sub>) lliures. Molts dels tipus d'aminoàcids existents formen proteïnes mitjançant la seva unió a partir d'un enllaç peptídic, el qual enllaça un grup amino d'un aminoàcid amb un grup carboxil d'un altre.

**Amplíc:** fragment de DNA o cDNA del qual s'obtenen múltiples còpies per PCR.

**Amplificació:** alteració cromosòmica mitjançant la qual s'adquireixen múltiples còpies d'un mateix gen per replicació del fragment de DNA que el conté.

**Anèmia:** situació en què disminueix el nombre d'eritròcits, la quantitat d'hemoglobina o el valor d'hematòcrit d'un pacient.

**Angiogènesi:** procés fisiològic que consisteix en la formació de vasos sanguinis nous a partir de vasos ja existents, essencial pel desenvolupament embrionari dels organismes i la cicatrització; encara que també és molt important en la transformació maligna del càncer.

**Anticòs:** tipus de proteïna produïda pels limfòcits B activats que té com a funció reconèixer cossos estranys (bacteris, virus, etc) que puguin danyar l'organisme. Es pot trobar unit a la membrana cel·lular del limfòcit B que la produeix tot formant part del seu receptor; o bé secretar-se.

**Antigen:** molècula que indueix la producció d'anticossos.

**Apoptosi:** procés fisiològic que desencadena la mort cel·lular, clau pel desenvolupament embrionari de l'organisme i l'eliminació de cèl·lules potencialment perilloses.

**Autosoma:** tipus de cromosoma que no determina el sexe de l'individu.

**Càncer:** conjunt de malalties diferents que tenen com a característica comuna una proliferació cel·lular descontrolada per adquisició d'alteracions genètiques en el genoma d'una cèl·lula.

**Cariotip:** ordenament dels cromosomes d'un organisme en base a la seva morfologia i mida.

**Caspasa:** proteïna essencial per l'apoptosi que pertany a la família de les cisteïn proteases, les quals tenen un residu de cisteïna que media el trencament d'altres proteïnes. El tall en la molècula diana es produeix a nivell d'un residu aspartat (és una *cisteïnil-aspartat proteasa*).

**cDNA:** molècula de DNA de cadena senzilla complementària a un determinat mRNA, que s'obté per un procés de transcripció reversa.

**Cèl·lula autoreactiva:** cèl·lula B que no ha madurat correctament i que el propi sistema immunitari reconeix com a aberrant.

**Cèl·lula B de memòria:** cèl·lula B que no es diferencia, la funció de la qual és esdevenir cèl·lula de reserva per si es torna a produir un contacte amb l'antigen. Si aquest contacte es produeix, llavors la cèl·lula B de memòria dóna lloc a cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos.

**Cèl·lula mare:** cèl·lula poc diferenciada que pot donar lloc a qualsevol tipus de cèl·lula que forma un organisme.

**Cèl·lula *Natural Killer*:** tipus de cèl·lula que pertany al sistema immunitari innat i que ataca específicament les cèl·lules infectades per bacteris i virus.

**Cèl·lula plasmàtica:** cèl·lula B activada que es diferencia i produeix una gran quantitat d'anticossos.

**Cèl·lula quiescent:** cèl·lula en estat de repòs que no es divideix.

**Cèl·lula de Reed-Sternberg:** cèl·lula multinucleada que no s'assembla a cap altra cèl·lula existent a l'organisme, responsable de la formació del limfoma de Hodgkin.

**Centroblast:** tipus de cèl·lula dos o tres cops més gran que els limfòcits normals i que presenta un nucli vesicular, característica del limfoma fol·licular.

**Centròcit:** tipus de cèl·lula petita amb citoplasma escàs i nucli irregular; característica del limfoma fol·licular.

**Centròmer:** regió del cromosoma que dirigeix el seu moviment durant el procés de mitosi (anafase).

**Cicle cel·lular:** conjunt de processos pels quals una cèl·lula dóna lloc a dues cèl·lules filles.

**Ciclina:** proteïna que regula l'activitat de les cinases dependents de ciclins, essencial per la progressió del cicle cel·lular.

**Cinasa dependent de ciclina:** enzim que permet l'avanç del cicle cel·lular a través de la fosforilació d'altres proteïnes. S'associa reversiblement a les ciclins, esdevenint necessari per dur a terme la seva funció.

**Citogenètica:** part de la genètica que estudia el comportament dels cromosomes dins de la cèl·lula.

**Citoquina:** proteïna que regula la funció de les cèl·lules que la produeixen o bé d'altres tipus cel·lulars. És indispensable pels fenòmens de comunicació intercel·lular, migració i activació de receptors específics de membrana, entre d'altres.

**Clon:** conjunt de cèl·lules idèntiques.

**Centre germinal:** part del fol·licle limfoide secundari on les cèl·lules proliferen després d'haver-se trobat amb l'antigen.

**Cluster:** agrupació de mostres amb característiques definides que s'obté essencialment mitjançant una anàlisi de dades no supervisada.

**cRNA:** molècula de RNA de doble cadena que s'obté per transcripció a partir de cDNA de doble cadena en els protocols d'hibridació de les plataformes de microarrays.

**Cromatina:** grau de condensació del material genètic dins del nucli cel·lular, que implica l'associació del DNA a histones i altres proteïnes no històniques.

**Cromatografia:** tècnica de separació i identificació dels components d'una solució. Consta d'una *fase mòbil*, fluid que arrossega la mostra d'estudi; i d'una *fase estacionària*, matriu sòlida o fluida fixada a una base sòlida que permet la separació dels components i a través de la qual passa la fase mòbil.

**Cromatograma:** representació gràfica del procés cromatogràfic, en forma de pics que corresponen a cada component separat de la solució.

**Cromosoma:** cos en forma de bastó que sorgeix de la condensació de la cromatina en el nucli cel·lular durant la mitosi.

**Deleció:** pèrdua d'un fragment de material genètic.

**Desnaturalització:** procés físic o químic pel qual es modifica l'estructura d'una molècula.

**Diferenciació cel·lular:** procés d'especialització pel qual les cèl·lules obtenen una forma i una funció determinades, esdeveniment que té lloc durant el desenvolupament embrionari i la vida de l'organisme.

**DNA:** àcid desoxiribonucleic (de l'anglès, *deoxyribonucleic acid*), molècula que és el component principal del material genètic i que consta d'un polímer format per uns monòmers particulars anomenats nucleòtids.

**DNAsa:** enzim que degrada el DNA.

**Dominant negatiu:** efecte que exerceix la forma alterada d'un gen (normalment per mutació) sobre la forma normal del mateix gen dins d'una cèl·lula, interferint en la seva funció. Aquest fet es dona especialment per la competència en la interacció de dit gen i la seva forma alterada amb d'altres factors.

**Dosi gènica:** nombre de còpies d'un al·lel d'un gen.

**Electroforesi:** tècnica de separació d'una mescla de molècules basada en la velocitat diferencial de migració a través d'un gel, i en funció de la mida i càrrega elèctrica de cada molècula.

**Enhancer:** regió petita de DNA no codificant a la qual es poden unir determinades proteïnes, que desencadenen l'augment de l'expressió d'un o més gens.

**Enzim:** tipus de proteïna capaç de modificar i augmentar la velocitat d'una reacció química en un context cel·lular.

**Enzim de restricció:** tipus d'enzim que reconeix una determinada seqüència del DNA de doble cadena i el talla en un punt concret, anomenat *diana de restricció*.

**Esplenomegàlia:** augment del volum de la melsa, la qual es pot palpar.

**EST:** de l'anglès *Expressed Sequence Tag*; són petits trossos de DNA d'uns 200-500 pb produïts a partir de la seqüenciació d'un o d'ambdós extrems d'un gen que s'expressa a la cèl·lula i que en són representatius.

**Exó:** segment de DNA codificant, que no s'elimina durant el procés de traducció i maduració del RNA.

**Exonucleasa:** enzim que talla nucleòtids un per un des d'un extrem d'una cadena polinucleotídica.

**Expressió gènica:** tipus i nivells de trànscripats (mRNA) presents a la cèl·lula en un moment determinat i que la caracteritzen.

**Factor de transcripció:** tipus de proteïna que regula l'expressió gènica de certs gens, mitjançant la seva unió directa o indirecta a una seqüència específica localitzada al promotor o *enhancer* del gen corresponent.

**Fenotip:** aparença externa d'un caràcter genètic, determinada per la interacció entre el genotip i les condicions ambientals.

**Fluorocrom:** molècula que emet fluorescència quan és excitada a una determinada longitud d'ona.

**Fol·licle limfoide primari:** tipus d'organització del teixit limfoide de forma esfèrica, per l'acumulació homogènia de limfòcits petits. Els fol·licles limfoïdes es troben dins de tots els òrgans encapsulats del sistema immunitari (ganglis, melsa, tim).

**Fol·licle limfoide secundari:** tipus d'organització del teixit limfoide de forma esfèrica, per l'acumulació de limfòcits. En aquesta classe de fol·licle limfoide és on es dona la interacció de les cèl·lules B amb diferents antígens, provocant-se el seu desenvolupament i maduració.

**Fosforilació:** addició d'un grup fosfat a una molècula.

**Gangli limfàtic:** o nòdul limfàtic, estructura en forma de nòdul que forma part del sistema limfàtic i del sistema immunitari. Es localitzen al coll, mediastí, abdomen, aixelles i engonals; i dins d'ells s'acumulen els limfòcits.

**Gen:** segment de la seqüència del DNA a partir del qual es pot sintetitzar una molècula amb funció específica. Constitueix l'unitat bàsica d'herència dels éssers vius.

**Gen supressor de tumors:** gen que regula i evita l'excés de proliferació cel·lular, reduint la probabilitat de què una cèl·lula esdevingui tumoral.

**Genoma:** material genètic que hi ha dins d'una cèl·lula, específicament el DNA nuclear.

**Genotip:** conjunt de gens que té un organisme.

**Guany:** addició d'un fragment de material genètic, mitjançant la qual s'adquireix una còpia de més d'un gen determinat per replicació del fragment de DNA que el conté.

**Heterocromatina:** forma altament condensada de la cromatina, la qual esdevé inactiva.

**Heterodúplex:** fragment de DNA en què les dues cadenes senzilles que formen la doble hèlix no poden complementar-se totalment.

**Heterozigot:** que té dos al·lells diferents d'un gen determinat. En el cas de parlar de delecions, les delecions heterozigotes són aquelles en què només es perd un al·lel del gen.

**Hibridació:** tècnica molecular que consisteix en separar les dues cadenes que formen la molècula del DNA i permetre que es reanellin posteriorment amb altres cadenes senzilles de DNA o RNA del qual són complementàries.

**Hipermutació somàtica:** procés de modificació de les regions variables dels gens que codifiquen per la cadena pesada de les immunoglobulines de les cèl·lules B, pel qual dites cèl·lules esdevenen més afins a l'antigen amb què han interactuat.

**Homeòstasi cel·lular:** estat d'equilibri dinàmic en què una cèl·lula assoleix una certa estabilitat del seu medi intern.

**Homodúplex:** fragment de DNA en què les dues cadenes senzilles que formen la doble hèlix es complementen perfectament.

**Homòleg:** factor que té les mateixes característiques que un altre.

**Homozigot:** que té dos al·lells iguals d'un gen determinat. En el cas de parlar de delecions, les delecions homozigotes són aquelles en què es perden els dos al·lells del gen.

**Immunoblast:** tipus de cèl·lula amb el citoplasma més abundant i amb un o més nucleols prominents en situació central, característica del limfoma difús de cèl·lules grans.

**Immunofenotip:** identificació i quantificació d'una població cel·lular en funció de l'expressió de certs marcadors de membrana, mitjançant l'ús d'anticossos específics.

**Immunoglobulina:** anticòs.



**Immunohistoquímica:** tècnica que permet detectar un factor cel·lular determinat mitjançant l'ús d'un anticòs específic marcat amb una molècula que fa visible la interacció antígen-anticòs.

**Indolent:** tipus de tumor caracteritzat per un baix índex proliferatiu i millor pronòstic, amb poca manifestació de signes i símptomes, o bé d'intensitat moderada.

**Inestabilitat genètica:** situació d'alteració del genoma d'una cèl·lula per diferents mecanismes, i que predisposa al desenvolupament d'un tumor.

**Interfase:** estadi del cicle cel·lular en què la cèl·lula genera tots els components necessaris per donar lloc a les dues cèl·lules filles. Es divideix en tres fases anomenades G<sub>1</sub>, S i G<sub>2</sub>.

**Interferó:** proteïna produïda pel sistema immunitari en resposta a la seva infecció per part de virus, bacteris i paràsits. També es pot secretar davant de situacions de tumorigènesi.

**Intró:** segment del DNA que forma un gen que s'elimina durant el procés de traducció i maduració del seu RNA.

**Inversió:** alteració cromosòmica que consisteix en el canvi de sentit d'una seqüència de DNA.

**Isotip:** tipus d'anticòs determinat per la classe de cadena pesada que el forma. Hi ha cinc isotips: IgM, IgG, IgD, IgA i IgE.

**Ki67:** anticòs monoclonal que reconeix un antígen nuclear que només s'expressa en cèl·lules que proliferen (fase G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> i M) però no en cèl·lules en estat de repòs o quiescents. Es fa servir per detectar la taxa de proliferació tumoral mitjançant immunohistoquímica.

**Leucèmia:** grup de malalties caracteritzat per la proliferació de cèl·lules B tumorals en circulació sanguínia.

**Limfadenopatia:** augment patològic del volum dels ganglis limfàtics.

**Limfòcit:** tipus de cèl·lula sanguínia implicada en els processos del sistema immunitari.

**Limfòcit B:** tipus de limfòcit que juga un paper molt important en la resposta immune humoral. Es produeix a la medul·la òssia i la seva funció és produir anticossos contra antígens determinats.

**Limfòcit T:** tipus de limfòcit que participa en la resposta immune cel·lular. Es produeix al tim.

**Limfocitosi:** augment del nombre de limfòcits tumorals en sang.

**Limfoma:** grup de malalties caracteritzat per la formació de tumors sòlids de cèl·lules B tumorals a partir de teixit limfoide.

**Limfomagènesi:** procés de formació i desenvolupament dels limfòcits.

**Llibreria genòmica:** col·lecció dels milers de fragments corresponents al genoma complet d'un organisme, els quals s'introdueixen en un vector de clonació.

**Locus:** localització d'un gen en un cromosoma (plural: *loci*).

**Medul·la òssia:** teixit que es troba a dins dels ossos llargs, el qual és responsable de la producció de les cèl·lules sanguínies.

**Melsa:** òrgan limfàtic de situació abdominal en què es destrueixen els eritròcits vells.

**Metafase:** fase de la mitosi en què els cromosomes s'alineen al fus mitòtic en base als seus centròmers, formant la placa equatorial.

**Metàstasi:** disseminació de les cèl·lules tumorals a nous teixits i òrgans diferents del teixit d'origen. La presència de metàstasi implica un empitjorament del pronòstic i tractament del càncer.

**Metilació:** modificació del DNA en què es transfereix un grup metil a una citosina.

**Microambient:** característiques de l'entorn d'una cèl·lula tumoral que n'afecten el seu comportament i desenvolupament.

**Microarray:** plataforma formada per un conjunt de petits fragments de DNA adherits a una superfície sòlida (vidre, plàstic o silicó) que permet estudiar els nivells d'expressió de milers de gens a la vegada en una única mostra.

**MicroRNA:** petits RNAs no codificants de ~19-25 nucleòtids, que participen regulant la transcripció de determinats gens en una gran diversitat d'organismes.

**Microsatèl·lit:** repetició en tàndem de seqüències curtes (entre 1 i 4 nucleòtids) que no es transcriu i que es distribueix aleatòriament per tot el genoma.

**Mitocondri:** òrganul que es troba dins les cèl·lules eucariotes i que s'encarrega de produir l'energia necessària per dur a terme les diverses activitats cel·lulars.

**Mitosi:** fase del cicle cel·lular que consisteix en 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.

**Monoclonal:** derivat d'una única cèl·lula.

**mRNA:** tipus de RNA que conté la informació genètica procedent del DNA, necessària per la síntesi de proteïnes.

**Mutació:** canvi del material genètic que provoca una alteració permanent d'un caràcter hereditari. El seu origen pot ser degut a l'atzar o per l'acció de certs agents físics, químics o radioactius.

**Neoplàsia:** formació de nou teixit de tipus tumoral.

**Northern Blot:** tècnica molecular utilitzada per estudiar l'expressió gènica, en què els nivells de RNA d'un gen d'interès s'analitzen per electroforesi i es detecten per hibridació d'una sonda específica.

**Nucleòtid:** molècula que constitueix la unitat estructural bàsica del DNA. Consta d'una base nitrogenada, un glúcid de cinc àtoms de carboni (pentosa) i àcid fosfòric. La pentosa pot ser una desoxiribosa (DNA) o una ribosa (RNA).

**Oligonucleòtid:** seqüència curta de DNA o RNA (3-50 nucleòtids).

**Oncogen:** forma mutada d'un gen normal, anomenat *proto-oncogen*, que un cop activat estimula el creixement i proliferació de les cèl·lules tumorals.

**Pancitopènia:** disminució del nombre d'eritròcits, leucòcits i plaquetes a la sang perifèrica d'un pacient.

**Pèptid:** molècula polimèrica formada per 2-50 aminoàcids (monòmers) units mitjançant enllaços peptídics.

**Ploïdia:** nombre de dotacions cromosòmiques homòlogues existents en una cèl·lula, codificant cada dotació per tots els trets biològics de l'organisme en qüestió.

**Polimerasa:** tipus d'enzim que catalitza la producció d'àcids nucleics (DNA o RNA) a partir d'un motlle de DNA o RNA ja existent.

**Polimorfisme:** variació en la seqüència del DNA que codifica per un gen determinat, que molts cops condueix a un fenotip diferent.

**Proenzim:** precursor inactiu d'un enzim.

**Progressió:** conjunt de canvis clínics, morfològics i biològics que es donen en un tumor i que impliquen un agreujament dels símptomes de la malaltia.

**Proteasa:** enzim que degrada altres proteïnes.

**Proteïna:** molècula polimèrica formada per >50 aminoàcids (monòmers) units mitjançant enllaços peptídics.

**Proteòlisi:** reacció química mitjançant la qual es trenquen els enllaços peptídics d'un pèptid o proteïna.

**Proteosoma:** complex de proteïnes encarregat de degradar proteïnes alterades o que ja no es necessiten, per proteòlisi. Els proteosomes es troben al nucli i citoplasma de les cèl·lules eucariotes.

**Proto-oncogen:** gen normal de l'organisme amb una funció reguladora molt important i implicat en processos de proliferació i diferenciació cel·lular. La seva alteració pot conduir a la transformació tumoral d'un cèl·lula.

**Pseudofol·licle:** estructura localitzada dins de la medul·la òssia i els ganglis limfàtics, en què proliferen els limfòcits B tumorals de la CLL. Té una estructura nodular i consta d'agregats de cèl·lules tumorals grans amb l'immunofenotip Ki67+, CD5+, CD10-, BCL6- i BCL2-. Les cèl·lules del pseudofol·licle també expressen survivina, una proteïna antiapoptòtica de la família de les IAPs.

**Recaiguda:** malaltia que no es cura amb el tractament aplicat i que es torna a reproduir.

**Remissió:** disminució de la intensitat dels símptomes d'una malaltia.

**RNA:** àcid ribonucleic (de l'anglès *ribonucleic acid*), molècula formada per una cadena de nucleòtids que actua com a intermediària de la transmissió de la informació genètica codificada pel DNA i la formació de les proteïnes corresponents.

**RNAsa:** enzim que degrada el RNA.

**Sang perifèrica:** sang que circula pel sistema sanguini i que no està retinguda en compartiments.

**Signatura gènica:** conjunt de gens que s'expressen coordinadament en associació amb un procés biològic determinat.

**Sistema immunitari:** conjunt de teixits, cèl·lules i molècules que defensen l'organisme d'infeccions, malalties i altres fenòmens biològics que el puguin danyar.

**Sonda:** *qPCR*: oligonucleòtid marcat doblement que emet un senyal de fluorescència quan es degrada. *Microarrays*: petita seqüència de cDNA o d'oligonucleòtids adherida a una superfície sòlida (vidre, plàstic o silicó) que permet l'estudi dels nivells d'expressió d'un gen determinat.

**Splicing:** modificació de l'informació genètica durant la fase de maduració del transcrit, en què s'eliminen els introns i s'ajunten els exons que formen un gen.

**Spot:** segment o unitat d'una plataforma de microarrays que conté sondes per interrogar un únic gen.

**Telòmer:** extrem polar d'un cromosoma.

**Tim:** glàndula mediastínica que forma part del sistema immunitari. És especialment rellevant en la maduració dels limfòcits T.

**Transcripció:** procés de síntesi i maduració del mRNA a partir d'una seqüència de DNA determinada, que implica l'eliminació de fragments del DNA de partida, l'addició de nous i la modificació de certes bases nitrogenades.

**Transcripció reversa:** síntesi de cDNA a partir d'una molècula de RNA.

**Transcrit:** cadena de mRNA còpia d'una seqüència de DNA determinada, la qual se sintetitza a partir de processos de transcripció.

**Translocació:** alteració cromosòmica que consisteix en l'intercanvi de parts entre cromosomes no homòlegs.

**Trombocitopènia:** disminució del nombre de plaquetes en sang.

**Tumor:** massa de cèl·lules tumorals independent dels teixits que l'envolten.

**Western Blot:** tècnica molecular utilitzada per caracteritzar proteïnes en una mostra determinada, mitjançant una anàlisi electroforètica i detecció de la proteïna d'interès mitjançant anticossos específics.

**Zona del mantell:** part del fol·licle limfoide secundari formada per limfòcits madurs.



## ÍNDEX DE TAULES

Tot seguit s'indexen les taules incloses als apartats de la *Introducció* i *Material i Mètodes*, però no les que apareixen als *Resultats* i que ja s'han referenciat en els articles corresponents.

**Taula 1:** *Classificació dels NHL de cèl·lula B basada en el sistema REAL/WHO* (pàgina 34)

**Taula 2:** *Estadiatge al diagnòstic de CLL pels sistemes de classificació de Rai i Binet* (pàgina 67)

**Taula 3:** *Resum dels principals factors de bon i mal pronòstic en CLL* (pàgina 70)

**Taula 4:** *Resum dels oligonucleòtids de PCR utilitzats en el present treball* (pàgina 115)

**Taula 5:** *Resum de les sondes i oligonucleòtids de qPCR per determinar la dosi gènica utilitzats en el present treball* (pàgina 128)

**Taula 6:** *Resum de les sondes i oligonucleòtids de qPCR per estudiar l'expressió gènica utilitzats en el present treball* (pàgina 131)

**Taula 7:** *Reactius emprats a les tècniques experimentals* (pàgina 133)

**Taula 8:** *Material fungible emprat a les tècniques experimentals* (pàgina 136)

**Taula 9:** *Maquinària de laboratori emprada a les tècniques experimentals* (pàgina 137)

## ÍNDIX DE FIGURES

Tot seguit s'indexen les figures incloses als apartats de la *Introducció* i *Material i Mètodes*, però no les que apareixen als *Resultats* i que ja s'han referenciat en els articles corresponents.

- Figura 1:** *Estadis de desenvolupament d'un càncer* (pàgina 29)
- Figura 2:** *Desenvolupament de les cèl·lules B i els diferents NHL* (pàgina 35)
- Figura 3:** *Imatge de cèl·lules tumorals de CLL* (pàgina 36)
- Figura 4:** *Imatge de cèl·lules tumorals de MCL* (pàgina 38)
- Figura 5:** *L'homeòstasi cel·lular i les seves alteracions* (pàgina 44)
- Figura 6:** *El cicle cel·lular: fases i punts de control* (pàgina 45)
- Figura 7:** *Els complexos ciclina-CDK en el cicle cel·lular i els seus reguladors* (pàgina 47)
- Figura 8:** *El locus INK4a/ARF: gens que codifica i vies cel·lulars implicades* (pàgina 49)
- Figura 9:** *La translocació t(11;14)(q13;q32)* (pàgina 52)
- Figura 10:** *Desregulació del cicle cel·lular en MCL* (pàgina 54)
- Figura 11:** *L'apoptosi: integració de la via intrínseca i extrínseca* (pàgina 58)
- Figura 12:** *L'estructura dels receptors de TRAIL* (pàgina 62)
- Figura 13:** *La senyalització apoptòtica mediada per TRAIL* (pàgina 63)
- Figura 14:** *Esquema de realització d'una CGH* (pàgina 78)
- Figura 15:** *Formació d'homodúplex i heterodúplex i la seva detecció mitjançant DHPLC* (pàgina 81)
- Figura 16:** *Procés de la PCR quantitativa a temps real.* (pàgina 83)
- Figura 17:** *Perfil de les corbes d'amplificació de qPCR* (pàgina 84)
- Figura 18:** *Procés d'hibridació dels microarrays d'oligonucleòtids* (pàgina 89)
- Figura 19:** *Gràfic de la qualitat del RNA (2100 Agilent Bioanalyzer®)* (pàgina 90)
- Figura 20:** *Esquema del procés d'amplificació exponencial durant la PCR* (pàgina 110)
- Figura 21:** *Esquema de la generació de seqüències amb canvis de nucleòtid com a control positiu* (pàgina 118)
- Figura 22:** *La tècnica de SSCP* (pàgina 122)

## RESUM DELS ARTICLES EN COL·LABORACIÓ

· Tort F, Hernández S, Beà S, Camacho E, Fernandez V, Esteller M, Fraga MF, Burek C, Rosenwald A, Hernández L and Campo E. ***Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms.*** *Leukemia.* 2005 Jan;19(1):112-7. (*Journal impact factor 2006: 6.146*)

*CHK1* gene encodes for a serine/threonine kinase involved in the regulation of cell cycle progression and DNA damage checkpoints. To determine the role of *CHK1* in the pathogenesis of lymphoid neoplasms and its relationship to other DNA damage response genes, we have analyzed the gene status, protein, and mRNA expression in a series of tumors and nonneoplastic lymphoid tissues. *CHK1* protein and mRNA expression levels were very low in both reactive tissues and resting lymphoid cells, whereas tumor samples showed a variable pattern of expression related to their proliferative activity. However, seven aggressive tumors showed a dissociate pattern of extremely low or negative protein expression in spite of a high proliferative activity. Four of these tumors were diffuse large B-cell lymphomas (DLCLs) with concordant reduced levels of mRNA, whereas one blastoid mantle cell lymphoma (B-MCL) and two DLCLs had relatively normal levels of mRNA. No gene mutations, deletions, or hypermethylation of the promoter region were detected in any of these cases. In all these tumors *ATM*, *CHK2*, and *p53* genes were wild type. These findings suggest that *CHK1* inactivation in NHLs occurs by loss of protein expression in a subset of aggressive variants alternatively to *ATM*, *CHK2*, and *p53* alterations..



### **L'expressió gènica i proteica de *CHK1* disminueix en les variants agressives de les neoplàsies limfoides humanes.**

El gen *CHK1* codifica per una serin/treonin cinasa implicada en la regulació de la progressió del cicle cel·lular i els punts de control del dany al DNA. Amb l'objectiu de determinar el paper de *CHK1* en la patogènesi de les neoplàsies limfoides i la seva relació amb altres gens de resposta al dany al DNA, hem analitzat l'estat del gen, la seva proteïna i l'expressió del mRNA en una sèrie de tumors i de teixits limfoides no tumorals. Els nivells d'expressió gènica i de la proteïna *CHK1* eren molt baixos tant en teixits reactius com en cèl·lules limfoides en repòs, mentre que les mostres tumorals mostraven un patró variable de l'expressió relacionat amb l'activitat proliferativa del tumor. Tot i això set tumors agressius mostraven un patró dissociat, amb una expressió proteica extremadament baixa o nula i una alta taxa de proliferació. Quatre d'aquests tumors eren limfomes difusos de cèl·lules grans (DLBCL) amb nivells concordants de baixa expressió de mRNA, mentre que un limfoma de cèl·lules del mantell blastoide (B-MCL) i dos DLBCL tenien nivells normals de mRNA de dit gen. No es van trobar mutacions, delecions o hipermetilacions del promotor de *CHK1* en cap d'aquests casos. En tots aquests tumors l'estat dels gens *ATM*, *CHK2*, i *p53* era normal. Aquestes troballes suggereixen que la inactivació de *CHK1* en NHL ocorre per pèrdua de la seva expressió proteica en un subgrup de variants agressives, alternativament a la presència d'alteracions en els gens *ATM*, *CHK2*, i *p53*.

· **Fernández V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A. Pathogenesis of Mantle-Cell Lymphoma: All Oncogenic Roads Lead to Dysregulation of Cell Cycle and DNA Damage Response Pathways. Journal of Clinical Oncology. 23:6364-6369. (Journal impact factor 2006: 13.598)**

Mantle-cell lymphoma (MCL) is a well-defined subtype of B-cell non-Hodgkin's lymphomas (B-NHL), accounts for approximately 6% of all lymphoid neoplasms, and has a median survival of 3 to 4 years. The genetic hallmark of MCL is the chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32) that leads to deregulation and upregulation of *CyclinD1*, an important regulator of the G1 phase of the cell cycle. This genetic event is present in virtually all cases of MCL, whereas additional genetic alterations that occur in subsets of MCL have been described. Most of these alterations appear to disturb the cell cycle machinery/interfere with the cellular response to DNA damage, thus making MCL a paradigm for cell cycle and DNA damage response dysregulation in cancer in general. In particular, *Cyclin D1* upregulation, genomic amplification of the cyclin-dependent kinase (*CDK*) -4, deletions of the CDK inhibitor *p16<sup>INK4a</sup>* and overexpression of *BMI-1*, a transcriptional repressor of the *p16<sup>INK4a</sup>* locus, are associated with dysregulation of the cell cycle machinery in MCL. The DNA damage response pathway is affected by frequent alterations of the ataxia telangiectasia mutated (*ATM*) kinase as well as occasional inactivation of checkpoint kinase (*CHK*)-1 and *CHK2* that are kinases that act downstream of *ATM* in response to detection of DNA damage. Moreover, *p53* is frequently targeted by alterations in MCL. A recent gene expression profiling study defined the proliferation signature, a quantitative measure of gene expression of proliferation-associated genes as the strongest survival predictor available to date allowing the definition of prognostic MCL subgroups that differ in median survival by more than 5 years.

**La patogènesi del Limfoma de Cèl·lules del Mantell: totes les vies oncogèniques condueixen a la desregulació del cicle cel·lular i de la resposta al dany al DNA.**

El limfoma de cèl·lules del mantell (MCL) es un subtipus de limfoma no-Hodgkin de cèl·lules B (B-NHL) molt ben definit que representa aproximadament el 6% del total de les neoplàsies limfoides, i que té una supervivència mitjana d'entre 3 i 4 anys. L'esdeveniment genètic clau del MCL és la translocació cromosòmica t(11;14)(q13;q32) que condueix a la desregulació i sobreexpressió de la *ciclina D1*, un regulador molt important de la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular. Aquesta alteració és present en pràcticament tots els casos de MCL, mentre que s'han descrit altres alteracions genètiques addicionals que poden trobar-se en diferents subtipus de MCL. La majoria d'aquestes alteracions semblen afectar la maquinària del cicle cel·lular i/o bé interferir amb la resposta cel·lular al dany al DNA, fent que el MCL sigui un tipus de càncer paradigma de la desregulació del cicle cel·lular i de la resposta al dany al DNA. Concretament, la sobreexpressió de *ciclina D1*, l'amplificació gènica de *CDK4*, la deleció de *p16<sup>INK4a</sup>* i la sobreexpressió de *BIM-1*, un repressor transcripcional del locus de *p16<sup>INK4a</sup>*, s'associen amb la desregulació de la maquinària del cicle cel·lular en MCL. La via de resposta al dany al DNA està afectada per alteracions de la cinasa *ATM*, així com per la inactivació ocasional de les cinases *CHK1* i *CHK2*, que també actuen en la via d'*ATM*. A més, *p53* es troba freqüentment alterat en MCL. Un estudi d'expressió gènica molt recent va definir la signatura de proliferació, una mesura quantitativa de l'expressió gènica d'un conjunt de gens associats a proliferació; com el predictor de supervivència més precís actualment per definir subgrups pronòstic de MCL que difereixen en un temps mitjà de supervivència de més de 5 anys.

· Pinyol M, Salaverria I, Bea S, Fernandez V, Colomo L, Campo E, Jares P. ***Unbalanced expression of licensing DNA replication factors occurs in a subset of mantle cell lymphomas with genomic instability. International Journal of Cancer 2006 Oct 11; 119(12): 2768-2774. (Journal impact factor 2006: 4.7)***

DNA licensing is a crucial process for chromosome replication control. Deregulation of the licensing factors *Cdt1*, *Cdc6* and the licensing inhibitor *geminin* has been associated with DNA replication defects and chromosomal instability. We examined the expression of these factors, in mantle cell lymphoma (MCL) and non-neoplastic lymphoid samples, and analysed the potential role of their deregulation in genomic instability. *Geminin*, *Cdt1* and *Cdc6* were coordinately expressed in non-neoplastic tissues and most MCL in relationship to the proliferative activity of the cells. However, 6 (18%) tumours showed an unbalanced “licensing signature” characterized by a higher expression of *Cdt1* and *Cdc6* than the negative regulator *geminin*. Tumours with this unbalanced signature and *p53/p14<sup>ARF</sup>* alterations had significantly higher number of chromosome abnormalities than lymphomas with *p53/p14<sup>ARF</sup>* alterations but with a normal licensing signature. No aberrations of *Cdct1*, *Cdc6*, and *geminin* genes were detected in cases with unbalanced licensing. However, tumours with p53/ARF inactivation and unbalanced licensing signature had significantly higher cyclin D1 levels than tumours with normal licensing signature. These results suggest that an unbalanced mRNA expression of licensing regulatory genes may play a role in the pathogenesis of the chromosomal instability of a subset of MCL with inactivation of the *p53/p14<sup>ARF</sup>* pathway.

**El desequilibri de l'expressió dels factors de replicació implicats en el *licensing* del DNA ocorre en un subgrup de limfomes de cèl·lules del mantell amb inestabilitat genòmica.**

El *licensing* del DNA és un procés crucial pel control de la replicació cromosòmica. La desregulació dels factors de *licensing* *Cdt1*, *Cdc6* i de l'inhibidor del *licensing* *geminin* s'ha associat amb defectes en la replicació del DNA i inestabilitat cromosòmica. Hem analitzat l'expressió gènica d'aquests factors en el limfoma de cèl·lules del mantell (MCL) i mostres limfoides no neoplàsiques, i estudiat el paper de la seva desregulació en la inestabilitat genètica. *Geminin*, *Cdt1* i *Cdc6* s'expressaven de forma coordinada en teixits no neoplàsics i en la gran majoria de MCL, en relació amb l'activitat proliferativa de les cèl·lules. Tot i això, 6 (18%) tumors presentaven una "signatura de *licensing*" desequilibrada caracteritzada per una expressió més alta de *Cdt1* i *Cdc6* que del regulador negatiu *geminin*. Els tumors amb una signatura desequilibrada i alteracions de la via *p53/p14<sup>ARF</sup>* tenien un nombre significativament major d'alteracions cromosòmiques que els limfomes amb alteracions de *p53/p14<sup>ARF</sup>* però signatura de *licensing* normal. No es van trobar alteracions dels gens *Cdt1*, *Cdc6* i *geminin* en els casos amb *licensing* desequilibrat. Tot i això els tumors amb inactivació de *p53/p14<sup>ARF</sup>* i signatura de *licensing* desequilibrada tenien uns nivells significativament més alts de *ciclina D1* que els tumors amb signatura de *licensing* normal. Aquests resultats suggereixen que el desequilibri de l'expressió gènica dels gens reguladors del *licensing* pot jugar un paper clau en la patogènesi de la inestabilitat cromosòmica d'un subgrup de MCL amb inactivació de la via de *p53/p14<sup>ARF</sup>*.

