

Implicancias del microambiente en la progresión de la Leucemia

Linfoide Crónica.

Integrantes:

Br. ALZOGARAY MARIANGEL

Br. BRIANO VICTORIA

Br. PRADO MARIA DE LUJAN

Br. PURTSCHER ANA PATRICIA

Br. QUINTA KAREN

Orientador:

Prof. Adj. Dr. PABLO OPPEZZO

Departamentos e Instituciones participantes:

Departamento de Inmunobiología.

Institut Pasteur de Montevideo – Laboratorio de Investigación en Leucemia Linfoide
Crónica



Índice de Contenidos:

| | Página |
|---|---------------|
| I. Resumen..... | 3 |
| II. Fundamentación de la propuesta..... | 3 |
| III. Introducción general..... | 4 |
| IV. Objetivos del trabajo..... | 7 |
| V. Metodología..... | 7 |
| VI. Resultados..... | 8 |
| A. Marcadores biológicos..... | 8 |
| B. Poblaciones proliferantes..... | 14 |
| C. Introducción al microambiente..... | 15 |
| • Células implicadas en el microambiente..... | 16 |
| • Quimioquinas..... | 18 |
| • El papel de la expresión de AID..... | 22 |
| VII. Discusión..... | 24 |
| VIII. Conclusiones y Perspectivas..... | 25 |
| IX. Agradecimientos..... | 25 |
| X. Anexos..... | 26 |
| XI. Referencias bibliográficas..... | 35 |

I. Resumen:

La Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) es un síndrome linfoproliferativo crónico que se caracteriza por la acumulación progresiva de linfocitos monoclonales de tipo B, morfológicamente maduros pero inmunológicamente incompetentes. Los avances tecnológicos han permitido observar que la heterogeneidad tanto clínica como molecular de la LLC depende de múltiples factores, tales como el reconocimiento del receptor de las células B (del inglés B-cell receptor -BCR-) por el antígeno, o el perfil de los genes de Inmunoglobulinas de la cadena pesada (IgVH), cuyo estudio permite dividir a la enfermedad en pacientes con genes IgVH mutados (mejor pronóstico) y no mutados (peor pronóstico). A su vez, la progresión de la enfermedad es influenciada por la expresión de ciertos marcadores biológicos, destacando ZAP-70, LPL, entre otros; así como por mutaciones en los genes que codifican para las proteínas NOTCH1, TP53, SF3B1 o MYD88 y anomalías cromosómicas como delección 13q14, 11q22/q23, 17p13 y trisomía 12. Por otra parte la progresión de esta leucemia está claramente influenciada por el microambiente tumoral quien regula de manera muy fina el equilibrio entre poblaciones quiescentes y proliferantes dentro del mismo paciente llevando a una mayor evolución o no de la neoplasia. En la interacción del microambiente con el clon tumoral resultan de gran importancia células como las “nurselike”, las “natural killer” (NK), así como también las células estromales y la expresión de diferentes factores solubles como las quimioquinas CXCR4/CXCL12, CXCR5/CXCL13, CCL3 y CCL4.

Todos estos factores juegan un rol principal en la progresión leucémica y serán abordados a lo largo de este trabajo monográfico, intentando plasmar los principales avances generados en los últimos años respecto a las implicancias del microambiente en la evolución y el pronóstico de la enfermedad.

II. Fundamento de la propuesta:

La LLC es la neoplasia más común en el mundo occidental presentándose sólo en la población adulta entre los 50 a 80 años. La célula tumoral es el linfocito B y se caracteriza por haber logrado escapar del programa de muerte celular y por lo tanto acumularse en sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides secundarios. La interacción que presenta el receptor de este linfocito B con el microambiente está relacionada a la progresión de la enfermedad. Al presente y a pesar de los adelantos realizados en el área terapéutica, en algunos pacientes esta leucemia

es incurable. Dado que es muy difícil predecir cuál será la evolución de los pacientes, se busca entender cómo influye el microambiente tumoral en la progresión de la enfermedad y cómo podría interrumpirse esta interacción para utilizar esta estrategia en el tratamiento. De esta manera se evalúan constantemente nuevas dianas terapéuticas asociadas al receptor, inhibidores moleculares así como agentes inmunomoduladores y terapias mediadas por células T, capaces de dirigir y modular la señales del microambiente para la destrucción del clon tumoral.

Aparte de la ya demostrada existencia de diferentes poblaciones del clon tumoral dentro de un mismo paciente; es de interés determinar cómo y con qué interactúan estas subpoblaciones y así determinan la progresión de la enfermedad y la resistencia a la terapéutica actual.

Este trabajo monográfico intentará realizar una revisión actualizada sobre la implicancia que tiene el microambiente y su interacción con el linfocito B tumoral en la progresión de esta enfermedad. Intentaremos centrarnos en los últimos trabajos en el área, los cuales estudiando las distintas subpoblaciones tumorales, intentan establecer nuevos blancos y estrategias terapéuticas.

III. Introducción General:

La LLC es la leucemia más común en el adulto del mundo occidental. Se caracteriza por la acumulación de pequeños linfocitos B incompetentes con un aspecto maduro en sangre, médula ósea, ganglios linfáticos u otros tejidos linfoides. A diferencia de otras formas de leucemia, el componente proliferativo de LLC es relativamente pequeño, predominando la disminución de la capacidad de apoptosis o muerte celular programada por parte de las células leucémicas. [1]

Epidemiología:

El registro de datos estima una incidencia en Uruguay de LLC de 5,24 por cada 100.000 personas, con una edad media al diagnóstico de 72 años. La tasa de incidencia en los hombres es casi dos veces mayor que en las mujeres.

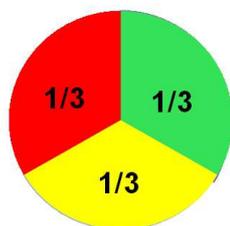
Existe una variación geográfica sustancial en la incidencia, la misma es alta en América del Norte, Europa y los países de América del Sur con alta tasa de inmigración europea y muy baja en las personas de origen africano o asiático[1]. La edad avanzada y los antecedentes familiares de leucemia o linfoma son factores de riesgo adicionales[2, 3].

Clínica:

Los síntomas comunes incluyen crecimiento de los ganglios linfáticos, síntomas constitucionales y la insuficiencia de la médula ósea. La mayoría de los pacientes son asintomáticos al momento del diagnóstico[4-7].

La acumulación progresiva de los linfocitos B monoclonales conduce a leucocitosis, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, insuficiencia de la médula ósea, infección recurrente y a veces se asocia con enfermedad autoinmunes (principalmente con anemia hemolítica autoinmune)[1].

La LLC es una entidad clínica que presenta una notable heterogeneidad, concepto representado por la hipótesis de los tres tercios postulada por Dighiero y col. [8]. La expectativa de vida de los pacientes con LLC al momento del diagnóstico es muy variable y oscila entre aquellos que viven durante años con una enfermedad estable y sin medicación a otros que mueren a los pocos meses aún bajo tratamiento, existiendo un tercer grupo con una fase inicial indolente que es seguida por progresión de la enfermedad.



Dighiero et al., N Eng J Med, 1998

- Never requires treatment and has a long survival.
- An initial indolent phase followed by disease progression and treatment requirement.
- Remaining third exhibits an aggressive disease and needs immediate treatment

Imagen 1: Heterogeneidad clínica. Teoría de los 3 tercios.

Características biológicas: La LLC tiene un repertorio de marcadores inmunológicos distintivo que la diferencia de otros linfomas de células B. Las células de LLC se define por los niveles de inmunoglobulina de superficie de membrana débil (Ig) (lo más a menudo IgM o ambos IgM e IgD) y la expresión en la célula B de antígenos CD23, CD19 y CD20 (débil), con la co-expresión de CD5.

Los mecanismos patogénicos más destacados incluyen: (1) conducción de antígenos y receptores de células B estereotipados; (2) la estimulación microambiental; y (3) las

aberraciones genómicas dirigidas a genes críticos (por ejemplo, los miRNAs 15 y 16, IgVH, TP53, ATM, NOTCH1). Mientras que la secuencia precisa de estos eventos es actualmente poco clara. (Ver anexo 1)

Diagnóstico:

Su diagnóstico se realiza a través de un recuento de linfocitos B clonales mayor a 5.000 /ul en sangre por al menos tres meses. Se confirmará su carácter monoclonal por un estudio de inmunofenotipo y estudio de genes de IgVH. Al realizar un frotis de sangre periférica se observarán característicamente linfocitos pequeños y medianos, con un gran núcleo con cromatina compacta que no posee nucleólo y citoplasma escaso. Podrá comprobarse en algunos casos la presencia de sombras de Gumprecht, como resultado de la ruptura de las frágiles células neoplásicas durante la preparación.

Estadificación y pronóstico:

Los sistemas de clasificación se basan en la presencia de linfadenopatía, organomegalia, valores de plaquetas y hemoglobina. Los sistemas Rai y Binet tienen influencias importantes en las decisiones de tratamiento y el pronóstico, considerando como factores condicionantes el estadio clínico, los marcadores séricos (por ejemplo, timidina quinasa, β 2-microglobulina y CD23 soluble), la expresión de marcadores celulares (por ejemplo, CD38 y ZAP-70) y los parámetros genéticos (por ejemplo, el estado mutacional de los genes IgVH, aberraciones genómicas como deleciones 17p13 y 11q23, mutaciones TP53 y ATM)[1]. (Ver anexo 2-3)

La enfermedad refractaria a la fludarabina se asocia con un muy mal pronóstico y con mutación TP53 y / o deleción 17p13[1].

Los pacientes jóvenes que tienen un perfil genético desfavorable (supresión 17p13) y los pacientes con una pobre respuesta a la terapia son candidatos a trasplante alogénico de células madre[1].

Posibilidades terapéuticas y resistencia al tratamiento:

En contraste con la mayoría de otras leucemias, la LLC no se trata necesariamente al momento del diagnóstico, sino más bien después de la enfermedad sintomática[4]. Esta estrategia se basa principalmente en los resultados de los ensayos aleatorios que compararon tratamiento temprano

y tardío que no mostraron ningún beneficio del tratamiento precoz[9]. Sin embargo, los ensayos de intervención temprana están actualmente seleccionando subgrupos de alto riesgo de LLC basados en criterios biológicos y clínicos para reevaluar la intervención temprana[1].

Esto depende de la identificación de factores pronósticos y predictivos que tienen el impacto clínico más fuerte. Los más poderosos factores pronósticos en LLC son la edad, la etapa Binet o clasificación Rai, los marcadores séricos[10] y los factores genéticos (como aberraciones genómicas[11], estado IgVH[12], mutación ZAP-70 [13] y mutaciones de TP53[14]). (Ver anexo 2)

A pesar de las opciones de tratamiento altamente efectivos, todos los pacientes con LLC sufren eventual recaída después de la terapia convencional. Los pacientes que recaen dentro de 2 años después de la terapia intensiva de primera línea tienen una mala respuesta al tratamiento y corta supervivencia global[1]. La existencia de subclones está mejor documentada en casos de delección 17p13 y la mutación TP53; sin embargo, también es probable que existan otras mutaciones o epimutaciones no identificadas, lo que lleva a la quimio-resistencia[15].

La delección 17p13 y la mutación TP53 se asocia a una respuesta pobre al tratamiento con análogos de las purinas[16, 17]. A su vez los pacientes con delección 11q (ATM) presentan respuesta de corta duración a no ser que se traten con quimioinmunoterapia.

IV. Objetivos del trabajo:

Llevar a cabo una exhaustiva y actualizada revisión bibliográfica sobre las características del microambiente de la LLC y sus implicancias en la progresión de la enfermedad.

V. Metodología del trabajo:

El trabajo comprende la realización de una revisión bibliográfica actualizada sobre el rol del microambiente tumoral y su relación con la progresión leucémica. Para llevarlo a cabo, se partirá del análisis de revisiones y artículos científicos publicados, previamente seleccionados

por el docente orientador. A partir de allí se ampliará la búsqueda bibliográfica con las referencias señaladas en dichos documentos.

Para lograr tal fin se dividirá el equipo de trabajo de manera que dos o tres estudiantes se encarguen del área más general (biología, etiología, fisiopatología y tratamiento de la enfermedad) y los restantes del área más específica, focalizándose en la interacción de la célula tumoral con el microambiente y sus implicancias en la progresión de la enfermedad.

VI. RESULTADOS

Marcadores biológicos

Dentro de los tres grupos con distinta evolución clínica de LLC (imagen 1), el grupo intermedio que comienzan con enfermedad indolente y luego cambia su comportamiento por uno más agresivo; es el grupo de mayor preocupación para los médicos tratantes. Para poder identificar mejor estos pacientes se han encontrado marcadores moleculares y celulares indicadores de enfermedad más agresiva y progresión más rápida, como son el ZAP-70, IgVH y la expresión anómala del gen LPL, además se reconocen distintos eventos variables que pueden estar presentes en la biología del linfocito leucémico, tales como, aberraciones genéticas, deleciones 17p13, 13q14, ATM, trisomía 12, y otras mutaciones como las del protooncogen NOTCH1.

1. Progresión de LLC relacionada con región VH:

La secuencia de aminoácidos de las porciones variables de las cadenas H y L es característica de cada linfocito B maduro, existiendo millones de moléculas distintas de Inmunoglobulinas (Igs) en un mismo individuo. Esta enorme diversidad de Igs se genera a través de dos procesos moleculares diferentes que tienen lugar en distintas etapas de la vida del linfocito B. El primer proceso denominado recombinación génica ocurre en la médula ósea durante la maduración de los linfocitos B a partir de precursores linfopoyéticos y es previo al contacto con el antígeno. El segundo proceso responsable de aumentar la diversidad de Igs se conoce como hipermutación somática y tiene lugar en los tejidos linfáticos secundarios (nódulos linfáticos, bazo, placas de Peyer) durante la formación del centro germinal como respuesta al contacto con el antígeno. La hipermutación somática consiste en la acumulación de cambios puntuales de bases (mutaciones) en los genes que codifican para las regiones variables de las cadenas L y H.

Tal como veremos más adelante, alrededor del 50% de los pacientes con LLC poseen mutaciones a consecuencia del proceso de hipermutación somática en la Ig del clon leucémico[18].

La comprensión de los mecanismos patológicos implicados en la LLC ha ayudado a dividir la enfermedad en dos subgrupos: casos con o sin mutaciones somáticas en los genes IgVH que tienen comportamientos clínicos y biológicos distintos, asumiendo un profundo impacto en el pronóstico y el tratamiento[18]. Así, la falta de mutaciones en los genes IgVH del clon leucémico se asocia con una enfermedad más agresiva que conduce a la muerte del 50% de los pacientes 6 a 8 años después del diagnóstico, aún bajo tratamiento quimioterápico; mientras que los enfermos con IgVH mutadas presentan una enfermedad estable con una media de supervivencia superior a los 20 años (Ver anexo 3). Las mutaciones IgVH se detectan por secuenciación, de forma que una secuencia que difiera en un 2% o más de la línea germinal se considera mutada[19].

Estos subgrupos difieren también en las longitudes de los telómeros, pues IgVH no mutada tiene mayor capacidad proliferativa que IgVH mutada[1]. Hay una probabilidad notablemente diferente de llevar o adquirir lesiones genéticas perjudiciales (11q23 y delección 17p13), ambas subclases comparten aberraciones genómicas, pero la incidencia de aberraciones de alto riesgo es mayor en LLC que tienen IgVH no mutadas.

En la LLC mutada las células B tienen menor capacidad de apoptosis, supervivencia o proliferación. Esto parece deberse a la incapacidad de unión del antígeno debido a cambios en la conformación del receptor por mutaciones de genes IgVH o defectos en las señales de transducción mediadas por BCR[20]. (Ver anexo 4)

2. Expresión de ZAP-70:

Por análisis de expresión diferencial de genes mediante la técnica de *microarrays*, se encontró que las células leucémicas con IgVH mutado o no mutado difieren en una gran cantidad de genes[21]. Entre ellos hay que destacar la expresión de la proteína quinasa ZAP-70 en el grupo no mutado. ZAP-70 es una proteína quinasa normalmente presente en linfocitos T y células NK, que participa en la transducción de señales a través de receptores de activación, como el receptor antigénico de linfocitos T (TCR)[22].

Las células LLC ZAP-70⁺ presentan una mayor capacidad para traducir señales de activación a través del BCR cuando se las compara con las células leucémicas negativas para dicho marcador. Después de la estimulación del BCR en la LLC, moléculas clave de la cascada de señalización, tales como Syk y ZAP-70 son activadas con la consiguiente mayor actividad celular, proliferación y adquisición de lesiones genéticas[22]. En la LLC con IgVH no mutadas el BCR es generalmente polirreactivo a autoantígenos derivados de proteínas o lípidos endógenos o exógenos generados, por ejemplo, por el estrés oxidativo, mientras que en la LLC que presenta IgVH mutada existe señalización BCR débil y son relativamente anérgicos.

Por otro lado, numerosos trabajos han demostrado que la expresión de CD38 en las células LLC es un factor pronóstico independiente de las mutaciones cuya presencia se correlaciona con una enfermedad más agresiva[23]. La molécula CD38 es una ectoenzima que sintetiza componentes claves para la regulación de los niveles intracitoplasmáticos de calcio y su entrecruzamiento luego de interactuar con su ligando natural, el CD31 o con anticuerpos específicos induce la transducción de señales y la activación celular en linfocitos T, células NK, linfocitos B normales y las propias células LLC[24].

Los pacientes que expresan alguno de los dos marcadores en sus células leucémicas (ZAP-70⁺CD38⁻ o ZAP-70⁻CD38⁺), y más aún aquellos que son positivos para ambos (ZAP-70⁺CD38⁺) poseen mayor linfocitosis en sangre periférica e infiltración medular y requieren tratamiento quimioterápico mucho antes que los pacientes dobles negativos (ZAP-70⁻CD38⁻)

Las señales de sobrevida que reciben las células LLC *in vivo*, no serían solamente de naturaleza soluble. Por ejemplo, se ha reportado que la interacción de la molécula CD40 presente en la membrana de las células LLC con su ligando específico, el CD40L (CD154), favorece un marcado incremento en la expresión de moléculas de adhesión y de coestimulación, además de un aumento en la proliferación y producción de diversas citoquinas. Por otro lado la interacción de CD40 de las células LLC con el CD40L expresado en células transfectadas inhibe la apoptosis de las células leucémicas incrementando la expresión de proteínas anti-apoptóticas[1].

3. Expresión de LPL

Otro de los marcadores de pacientes no mutados encontrados luego de análisis de arrays ha sido el ARNm del gen LPL. Su expresión aberrante es un marcador indirecto del estado mutacional de IgVH y se asocia a una progresión más rápida y peor pronóstico de LLC[25].

La metilación aberrante del ADN desempeña un papel importante en la tumorigénesis, donde la hipometilación de todo el genoma y la hipermetilación en regiones promotoras de genes supresores tumorales son característicos de muchos tipos de cáncer[25, 26].

La sobreexpresión del RNAm del gen LPL parece estar asociado al estado de metilación de la región promotora de dicho gen. En la investigación de Abreu y col. del 2012 se comprueba que existe una diferencia de metilación del primer intrón / exón (R1) del gen de LPL de los pacientes no mutados con respecto de los mutados; al analizarse esta región se vio que son ricas en secuencias CpG y que el estado de esta región sería el responsable de la sobreexpresión de la LPL en la LLC. Cuando esta región se encuentra en estado metilado hay poca o nula expresión de LPL y viceversa cuando se encuentra desmetilado hay sobreexpresión de LPL. Por lo tanto podríamos decir que la metilación del primer exón es crítico para el silenciamiento transcripcional[25].

Además de esto la expresión LPL parece correlacionarse con las señales del microambiente, por lo que se ha propuesto la hipótesis de que la expresión de LPL en pacientes progresores podría tener una función de puente entre la célula tumoral y los tejidos. En este contexto la expresión de LPL podría estar asociada con la proliferación celular y la capacidad migratoria del subconjunto de células proliferantes en la LLC a través de una conexión constante que facilite las interacciones específicas con las células accesorias en el microambiente del tejido[27].

4. Aberraciones genéticas en la LLC

Un 80% de los pacientes con LLC presentan alteraciones citogenéticas detectables por técnica de FISH, las más comunes son las deleciones en 13q, 11q, 17p, y trisomía 12. La deleción 13q14 se considera un fenómeno primario en la patogenia de la LLC [28, 29]. La deleción del 17p provoca la disfunción del gen TP53, pero este gen también está mutado en algunos casos en ausencia de deleción. Así mismo la deleción y mutaciones de la región 11q promueven la pérdida de la función ATM. (Ver anexo 5)

4.1 Las deleciones en la región 17p13 o mutaciones TP53:

La deleción de 17p13 se encuentra en 4-9% de las LLC al momento del diagnóstico o en el inicio de la primera sesión de tratamiento[11, 16]. Aunque la deleción 17p13 por lo general abarca la mayor parte del brazo corto del cromosoma 17p, la deleción siempre incluye la banda 17p13, donde se encuentra el supresor tumoral TP53 (que codifica p53)[14, 30, 31].

La delección 11q23 y mutaciones de TP53 se producen con mayor incidencia a medida que avanza la enfermedad, incluso pueden ser secundarias a lesiones genéticas, asumiendo un profundo efecto en la evolución clínica y el resultado de la enfermedad[1].

La delección 17p13 se asocia invariablemente con la pérdida o mutación de TP53, la cual es fundamental en la LLC refractaria a la quimioterapia con mala evolución, por lo tanto son los principales candidatos para las estrategias experimentales con nuevos agentes y trasplante de células madre[30].

Es importante apreciar que la mutación TP53 o delección 17p13 sólo explica una proporción de casos refractarios (25-50%). Otros componentes de la vía p53, incluyendo ATM y miR-34a (un componente microRNA de la vía p53), parecen contribuir a la resistencia a los medicamentos [32, 33].

4.2 Las deleciones de ATM (11q22-q23):

A pesar de que rara vez se encuentran en estadios tempranos de la enfermedad, aproximadamente una cuarta parte de los pacientes con LLC avanzada tienen deleciones 11q23[1, 11].

La región delecionada alberga el gen ATM en casi todos los casos. Un subconjunto de los casos mostró inactivación bialélica de ATM por mutación del alelo restante, quienes parecen tener un peor pronóstico[32].

La proteína quinasa ATM activa los puntos de control del ciclo celular, es un componente central de la vía de daño en el ADN y media las respuestas celulares a roturas de la cadena de ADN para su reparación.

La deficiencia de ATM conduce a la extrema sensibilidad a la irradiación, la inestabilidad genómica y una predisposición a enfermedades malignas linfoides.

Los pacientes con delección 11q tienen una progresión más rápida de la enfermedad, medida por intervalos libres de tratamiento más cortos y menor tiempo de supervivencia, asociado a linfadenopatías voluminosos (bulky) y expresión ZAP-70, pero no redujo la expresión de moléculas de adhesión a receptores de la superficie celular[30, 34].

Aunque la inactivación ATM se ha asociado con la refractariedad a la quimioterapia a través del fracaso para activar p53 y p21, los datos de ensayos aleatorios más grandes indican que la respuesta primaria es independiente de la presencia de delección 11q23. Los pacientes con delección 11q parecen beneficiarse particularmente del tratamiento intenso con FCR (fludarabina, ciclofosfamida, rituximab)[30, 35].

4.3 La trisomía 12:

Es una aberración frecuente en LLC (10 - 20% de los pacientes). Los genes implicados en su patogénesis son desconocidos y un peor pronóstico no está confirmado. La incidencia de la trisomía 12 no aumenta con la enfermedad avanzada. En los últimos resultados la tasa de respuesta y la supervivencia global para pacientes con trisomía 12 fue particularmente favorable[36]. Los casos con trisomía 12 expresan altos niveles de CD20 y rara vez muestran mutaciones de TP53 un hallazgo que puede contribuir a la evolución benigna[30, 37].

4.4 La delección 13q14:

Es la aberración cromosómica estructural más frecuente en la LLC (50 - 60%), como única anomalía se caracteriza por un curso favorable. La delección también se observa en, por ejemplo, linfoma, mieloma y cáncer de próstata. Se identificó que los dos microARN, miR-15a y miR-16-1, se ubican en la región crítica de la delección 13q14, lo que sugiere que el miR-15a / 16-1 tiene de hecho un papel patogénico en el desarrollo de la LLC[30]. Los mecanismos precisos por los que la desregulación de estos miRNAs conducen al cáncer están sin resolver, pero parecen ser reguladores de los elementos clave para el control de crecimiento, incluyendo la apoptosis y la progresión del ciclo celular[38].

5. Mutaciones génicas

Además de grandes reordenamientos cromosómicos y deleciones, las mutaciones genéticas somáticas recurrentes contribuyen a la patogénesis y las características de LLC[30].

Una mutación recientemente descubierta que ocurre en LLC afecta a la señalización de Notch, que es importante para diversos procesos fisiológicos y de desarrollo. La señalización Notch esta constitutivamente activa y NOTCH1 se sobreexpresa en las células de LLC humana. La activación de la señalización de Notch en células de LLC resulta en resistencia a la apoptosis[39]. Los primeros estudios de mutaciones NOTCH1 en LLC revelaron una delección

heterocigota del marco de lectura de 2 pb (Δ CT7544 - 7545, P2515Rfs * 4) que afectan a su dominio PEST, en aproximadamente 5% de los pacientes con LLC que conduce a un codón de stop prematuro, una falta del dominio C-terminal que contiene la secuencia PEST, y finalmente a una isoforma de NOTCH 1 más estable[30, 39, 40].

La agrupación con IgVH no mutada en LLC y casos con disrupción TP53, y la mutación se asoció con la supervivencia global más corta. Sorprendentemente, la delección es más frecuente (cerca de 20%) en pacientes con LLC progresiva o quimiorrefractaria[30, 41].

Tomando en conjunto, estos resultados sugieren que el estado mutacional de NOTCH1 podría contribuir a LLC de alto riesgo.

La secuenciación del genoma completo de las muestras de LLC también reveló una activación de mutación recurrente (L265P) en el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MYD88) en aproximadamente el 3% de los pacientes[40]. MYD88 es una proteína crucial para la interleucina 1 (IL-1) y la señalización TLR. MYD88 mutante es capaz de unirse muy eficientemente a IRAK1, una proteína esencial para las primeras respuestas a la estimulación TLR[42]. Es importante destacar que las mutaciones MYD88 se asociaron con IgVH mutado en LLC y la etapa clínica avanzada, mientras que no hay correlación con la progresión de la enfermedad o la supervivencia general[30, 40]. Curiosamente, la mutación L265P también fue demostrado en varios linfomas.

Población quiescente y proliferante

En la era de la microscopía óptica se pensaba que la LLC era una enfermedad por acumulación de células B, pero con el advenimiento de la citometría de flujo se pudo comprobar que la LLC es una enfermedad mucho más dinámica de lo que se pensaba anteriormente.[43]

Los últimos datos en esta área sugieren que dentro del clon tumoral existirán 2 poblaciones bien diferentes entre sí[44]. Las células de LLC circulantes en sangre periférica son células B en estado quiescentes, que se acumulan y no se dividen, mientras otra importante porción de células LLC proliferan en sitios microanatómicos específicos, los centros de proliferación o pseudofolículos, que representan una tasa de crecimiento diaria de 1-2% de todos los clones de LLC. Se ha observado en estudios realizados in vitro que tanto para la supervivencia como para la expansión clonal, las células LLC necesitan de señales externas desde el microambiente y de no ser así, la célula se somete a apoptosis espontánea en el cultivo, salvo que se co-cultiven con

células estromales[45]. Lo que plantea que en los tejidos linfáticos las células de LLC interactúan con diversas células del estroma como: CD68, células nerselike, células mesenquimales, células T CD4⁺.

La mayor parte de nuestro conocimiento sobre las células de LLC deriva del estudio de las células circulantes, pero no de aquellas que residen en los tejidos linfoides sólidos. Las células de LLC de la sangre son células menos vigorosas, pero estas a su vez podrían ser reclutadas en la fracción de proliferación, en caso de hacer su camino a tejidos sólidos y si encuentran condiciones ambientales adecuadas y señales accesorias.[43]

No se sabe bien si ambas poblaciones derivan de la misma línea celular y la población proliferante luego sufre nuevas mutaciones o de poblaciones diferentes. Lo que si esta claro es que la población de células de LLC proliferante expresa otros marcadores que las convierten en células muchos más agresivas y para que puedan sobreexpresar estos marcadores es importante la interacción con el microambiente[46]. Dentro de esta población existirían subpoblaciones con mayor sobre expresión de un tipo particular de marcador, por ejemplo sobreproducción de la enzima AID, sobreexpresión de CD38 y Ki67, expresión de CD5 y CXCR4 y finalmente un último trabajo de Huemer y col. muestra la expresión de CD86[8].

Introducción al microambiente:

Los tejidos linfáticos secundarios son el sitio principal para la expansión de las células B maduras normales, en última instancia conduce a la generación de células B específicas de antígeno y la maduración en las células plasmáticas productoras de anticuerpos[47].

Generalmente, las vías responsables para el crecimiento de células B normales específicas de antígeno parecen ser también funcionales en sus contrapartes de células malignas. Las células LLC interactúan con diferentes tipos de células estromales, tales como las células estromales mesenquimales[48], monocitos derivados de células de nodriza (NLC)[49], línea de células dendríticas y varios leucocitos de sangre periférica tales como células T[50], monocitos, NK, referidos colectivamente como "microambiente", y proliferan en el contexto de tejidos microanatómicos llamados centros de proliferación (pseudofolículos) en ganglios linfáticos y médula ósea, un hallazgo histopatológico sello distintivo en la LLC[51, 52].

Las células LLC se encuentran en el ciclo celular detenido (G0) y se acumulan en la sangre y órganos linfoides periféricos del paciente debido a la supervivencia prolongada[43, 53].

Mediante estudios como el inmunofenotipo se reveló que la composición del microambiente tiene gran impacto en el pronóstico de la enfermedad. Las células referidas anteriormente proporcionan factores solubles, proteínas extracelulares de la matriz y receptores de superficie que afectan a la proliferación y supervivencia de las células de la LLC[51, 54]. Además las células de LLC contribuyen activamente a la composición de su microambiente, mediante la secreción de factores solubles (CCL3, CCL4 y CCL22) [50] y las proteínas de la matriz extracelular o por el derramamiento de microvesículas que transfieren mensajes en la forma de proteínas o ARN[30, 55].

Varios receptores que son relevantes para la adhesión, la migración y atracción, fue demostrado que se expresan de forma aberrante en las células de LLC en comparación con las células B normales, en consecuencia, las células de LLC demostraron tener una capacidad mayor para adherirse y transmigrar a través de múltiples lechos vasculares endoteliales [51, 56].

Células implicadas en el microambiente.

1. Las células estromales mesenquimales (MSC)

En la médula ósea (MO), las células del estroma hematopoyéticas (HSC) se encuentran en "nichos" especializados, que están cerca de la vasculatura ósea (nicho vascular) o del endostio (nicho de osteoblastos)[57]. La alta afinidad de las células de LLC por las células del estroma se ejemplifica por un fenómeno sorprendente *in vitro* que describe la migración espontánea de una fracción de células de LLC debajo de las células del estroma de médula ósea (BMSC), además describe los complejos simbióticos de células leucémicas con su componente de células del estroma[51, 58]. Los co-cultivos de células de LLC con BMSC representan una herramienta útil para el estudio de la activación de células LLC por las BMSC, así como para la resistencia a los fármacos mediada por estroma. La activación de células LLC por BMSC es bidireccional.

Sobrenadantes de células de LLC activan los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) en BMSC, y el contacto con las células de LLC provoca la expresión de la proteína quinasa C II (PKC- II) y la posterior activación de NF- κ B en BMSC[51, 59]. Efectos de supervivencia de MSC también se han descrito en linfoma folicular (LF), y este tipo de células parece estar generalmente presente, a grados variables en todos los tipos de linfomas de células B[60].

2. Células "Nurselike" (NLC) y macrófagos asociados a linfoma (LAM)

Las células del linaje de monocitos, como NLC proporcionan diversas señales promotoras del crecimiento y parecen estar implicados en la activación BCR en los tejidos linfáticos. Ha sido demostrado que las NLC atraen células de LLC mediante la secreción de CXCL12 y CXCL13 y protegen las células de LLC de la apoptosis espontánea o inducida por fármacos a través de CXCL12[49, 61], BAFF, APRIL, CD31, plexin -B1, y la activación de la cascada de señalización BCR[51]. En otras neoplasias de células B, NLC se denominan macrófagos asociados a tumores o macrófagos asociados a linfoma. Estas células nurselike ayudan a la supervivencia de las células de LLC, y se demostró que han reducido la inmunocompetencia en comparación con las células generadas en co-cultivos de monocitos con las células B sanas[62]. A su vez, las células de LLC se describieron como responsables de los defectos en la formación de sinapsis inmunológica con las células T. Después del contacto con las células de LLC a través de receptores de adhesión, las células T muestran deterioro de la polimerización de la actina, lo que resulta en la formación de sinapsis inmunológica defectuosa y disminuye la inmunogenicidad[51].

3. Células T

El comportamiento de células T es anormal en LLC, con un aumento en los números absolutos de células T de sangre periférica, particularmente células T CD8⁺, con una caída en la proporción de CD4:CD8[51]. A pesar de sus números crecientes, estas células T muestran defectos funcionales profundos, evidencia de activación crónica y expansiones de las células T oligoclonales restringidas principalmente a las poblaciones con un fenotipo CD57⁺ activadas, lo que sugiere un papel para la estimulación antigénica crónica en su desarrollo. Las células T exhiben "agotamiento", con aumento de la expresión de marcadores de agotamiento CD244, CD160, y PD1, con expansión de un subconjunto PD1⁺ BLIMP1^{HI}. [63]. Estas células T tienen defectos funcionales en la citotoxicidad, con deterioro en el empaquetamiento de granzima en vesículas y degranulación no polarizada, las células T de LLC mostraron un aumento de la producción de interferón- γ y TNF- α y aumento de la expresión de TBET, y la producción normal de IL-2 es potencialmente protectora de la apoptosis de las células de LLC[51].

Las células T en LLC presentan cambios profundos en sus perfiles de expresión génica global con alteraciones en la expresión de genes implicados en la formación del citoesqueleto [64] que resulta en defectos funcionales en la polimerización de actina filamentosa (F-actina), con

defectos en la formación de la sinapsis inmunológica (IS) con las células presentadoras de antígenos (APC)[51]. La disminución de la polimerización de la actina también deteriora la migración mediada por la integrina, con alteración de activación Rho GTPasa. Además de una mayor expresión de receptores inhibitorios en la LLC, también hay un aumento en las células T reguladoras (T regs) $CD4^+$ $CD25^{hi}$ en la LLC, que aumenta en la enfermedad en estadio avanzado[65], mediado por aumento de la expresión de CD27 y CD200[51].

Las células T también parecen ser una parte integral de interferencias dentro del microambiente, proporcionando señales reguladoras críticas dentro de los nichos de tejidos. A su vez, las NLCs pueden contribuir al aumento del número de células T en pseudofoliculos vía BCR-dependiente de la secreción de quimiocinas (CCL3, CCL4)[66]. Esta combinación de quimiocinas de tejido (CXCL12, CCL3, CCL4) probablemente contribuye a colocalización de las células del estroma, NLCs, y las células T $CD4^+$ activadas, que proporcionan “sitios de santuario” para las células tumorales, protegiéndolas de inmuno-quimioterapia[51]. (Ver anexo 6)

4. Células "Natural Killers"

Las células NK también tienen un defecto funcional en la LLC, que muestra disminución de la capacidad para lisar líneas celulares de leucemia asociados con una falta de gránulos citoplasmáticos[67]. Las células de LLC también pueden inhibir células NK por contacto directo, por su expresión tolerogénica de moléculas no clásicas de MHC clase I, HLA-G, o mediante la expresión de ligando de 4-1BB[51]. Cabe destacar, las células NK de pacientes con LLC muestran la polimerización de actina defectuosa y deterioro de la formación de sinapsis inmunológica, comparable a la disfunción del citoesqueleto visto en las células T LLC[68]. El defecto de las células NK parece ser de importancia clínica, ya que se observaron los números de células NK más altos en los pacientes con enfermedad en estadio temprano y en aquellos con genes mutados IgVH. Además, para los pacientes con una etapa Rai dada, una mayor proporción de células NK-LLC fue predictivo de un tiempo más largo para el tratamiento, lo que implica un efecto protector de las células NK[51, 69].

Quimioquinas.

Tanto el transporte como la función de las células B normales depende de las interacciones establecidas entre las células B y las células estromales. Como muestra de esto se ha visto que las células del estroma en los tejidos linfáticos secundarios secretan de forma constitutiva

quimioquinas como CXCL12 y CXCL13 que orientan el posicionamiento de las células B dentro de los ganglios linfáticos[70, 71]. El tráfico y el “homing” necesitan de la cooperación entre receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión, como integrinas, CD44 y L-selectinas, las cuales son expresadas tanto en los linfocitos normales como malignos. Los linfocitos T y B expresan receptores para varias quimioquinas, y su expresión y función se modula durante su diferenciación y activación[72]. (Ver anexo 7). Los linfocitos circulantes interactúan de forma transitoria y reversible con el endotelio vascular a través de las moléculas de adhesión (integrinas, selectinas) en un proceso llamado rodación. Las quimioquinas en la superficie luminal del endotelio activan los receptores de quimioquinas en las células que rolan, lo que desencadena su activación. Esto determina la detención, la adhesión firme y la consiguiente migración transendotelial, lo que sucede en tejidos donde el gradiente de quimioquinas guían la localización y retención de células; proceso que en conjunto se denomina “homing”[73-75]. (Ver anexo 7)

1. CXCR4 (CD138) y su ligando CXCL12

CXCR4 es un receptor de quimioquinas expresado por la mayoría de las células hematopoyéticas (neutrófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos T y B maduros e inmaduros, células progenitoras CD34⁺ desde sangre periférica y médula ósea, células dendríticas derivadas de la sangre y células de Langerhans y también en células no hematopoyéticas, como neuronas y células endoteliales vasculares)[76]. A su vez es expresado en procesos patológicos, encontrándose en altos niveles en la superficie de células LLC en sangre periférica y media la quimiotaxis de estas células, su migración a través del endotelio vascular, la polimerización de la actina y la migración[45, 58].

La expresión de CXCR4 está regulada por su ligando CXCL12 (llamado anteriormente como factor 1 derivado de células estromales) a través de la endocitosis del receptor, con regulación a la baja de CXCR4 en los tejidos en que las células LLC expresan altos niveles de CXCL12.

Esto permite diferenciar entre tejidos (como tejido linfático y derivados de médula ósea) y las células LLC en sangre periférica, las que expresan respectivamente bajos y altos niveles[45, 58].

La señalización CXCR4 en células LLC induce la movilización del calcio, la activación de quinasas PI3, p44/42 MAP quinasa y fosforilación de serina de transductor de señal y activador

de la transcripción 3 (STAT 3)[45, 58]. CXCR4 es expresado como un receptor funcional en células B-LLC, siendo responsable de dirigirlos al microambiente de la médula ósea[76].

CXCL12 ha mostrado tener efectos antiapoptóticos (pro supervivencia) en células B-LLC y así protege de la apoptosis sea tanto espontánea como la inducida por agentes quimioterapéuticos mediante la vía contacto dependiente con células estromales o células nurselike; lo cual había sido verificado anteriormente como un factor estimulante del crecimiento de células pre-B [77] Redondo- Muñoz et al. identificaron la metaloproteínasa-9 (MMP-9), la que está regulada en más por CXCL12, como una importante proteína para la migración transendotelial de las células B-LLC a través de las membranas basales[76].

Algunos estudios plantean una correlación de la expresión de CXCR4 y CXCL12 con parámetros clínicos incluidos en la clasificación de Rai[78]; en contraparte otros grupos no encontraron ninguna relación entre la expresión de CXCR4 ni CXCL12 y el estadio clínico de la enfermedad o el patrón de infiltración de médula ósea, pero si plantea relación de la expresión de CXCR4 con el recuento de leucocitos[76].

Richardson et al. mediante el seguimiento de co-cultivos con células nurselike, las células positivas para tirosina quinasa ZAP-70 la supervivencia mejoró considerablemente al adicionar CXCL12 en comparación con células negativas para ZAP-70[76]. En uno de los estudios, se plantea que la señalización del BCR resulta en la modulación a la baja de CXCR4 con mejoras en la quimiotaxis hacia CXCL12 y CXCL13. Esto permite expresar por qué las células LLC ZAP-70⁺ presentan un aumento en la quimiotaxis y la supervivencia en respuesta a CXCL12 comparado a células ZAP-70⁻, esto plantea que la expresión de ZAP-70 se asocia a una capacidad de respuesta más alta a la estimulación BCR[45].

Las células LLC Ki 67⁺ proliferantes en médula ósea y tejido linfático muestran niveles mucho más bajos de CXCR4 y CXCR5 que las células LLC no proliferantes [79] Se ha demostrado *in vivo*, que en pacientes en que las células LLC tienen una mayor expresión de CXCR4 se retrasa la aparición de células CD 38⁺ recién producidas en sangre, aumentando el riesgo de infiltración de órganos linfoides, con la consiguiente mala evolución. También se ha revelado heterogeneidad de la expresión de CXCR4 intraclonal, con enriquecimiento de las células LLC que expresan niveles más bajos de CXCR4 en la fracción CD 38⁺/CD 5⁺, sumado a una mayor incorporación de ²H[45].

Las células LLC CD 38⁺ también muestran niveles más altos de quimiotaxis y la activación de este mejora la misma hacia CXCL12, mientras que un bloqueo por anticuerpos anti-CD 38 la inhibe[45]. (Ver anexo 8)

2. CXCR5 (CD 185) y su ligando CXCL13

Este es el receptor de quimioquina para CXCL13, único ligando, que regula la localización de linfocitos y posicionamiento dentro de los folículos linfoides[45]. Esta quimioquina es secretada tanto selectiva como constitutivamente en órganos linfáticos secundarios[76]. CXCR5 se expresa en células B maduras de médula ósea y sangre periférica, también en un subconjunto de células T (CD4⁺ y CD8⁺) y células dendríticas derivadas de la piel. CXCL13 es secretada constitutivamente por las células estromales en áreas de células B en folículos linfoides[45]. CXCL13 parece tener un mayor impacto en el direccionamiento de células B hacia zonas de células B de tejidos linfoides secundarios y, juntos con CCR7, aseguran un contacto cerrado entre las células B y T necesario para la activación de células B[76]. CXCR5 induce el reclutamiento desde la circulación a los folículos de células B nativas y es responsable de su ubicación en el centro germinal; también se plantea como receptor funcional en las células B leucémicas[61]. Se propone que la función primordial de CXCL13 sería el reclutamiento de células B primitivas a las cavidades del cuerpo para respuestas T-independientes. Las células LLC y linfoma de células del manto (MCL) expresan altos niveles de CXCR5 [61]. La estimulación de las células LLC con CXCL13 induce polimerización de actina, endocitosis del CXCR5, quimiotaxis y activación prolongada de MAPK (ERK ½). CXCR5 participa en el posicionamiento y las interacciones entre las células B malignas y células estromales secretoras CXCL13, como NLC/LAM en los tejidos linfoides[45].

Además CXCL13 fue encontrado considerablemente aumentado en el suero de pacientes LLC-B y parece tener correlación con niveles séricos de β 2 microglobulina[76]. (Ver anexo 8)

3. Quimioquinas secretadas por las células B malignas: CCL3, CCL4

Tanto CCL3 como CCL4 son quimio-atrayentes para monocitos y linfocitos. La expresión de CCL3 en células B normales es inducida por la activación de BCR y CD 40 ligando e inhibida por BCL6. Las células LLC activadas secretan y expresan CCL3 y CCL4 en respuesta a la estimulación del BCR y en co-cultivo con células nurselike [66]. Pacientes con LLC tienen altos niveles de CCL3 y CCL4 en plasma y los niveles plasmáticos de CCL3 mostraron ser

marcadores pronósticos [66]. Aún no es bien establecida su función, pero basado en la función de derivados de células B CCL3 y CCL4 en las respuestas inmunes normales, el aumento de la secreción CCL3 y 4 por las células LLC puede inducir el tráfico y “homing” de células accesorias, principalmente de células T y los monocitos hacia microambientes tisulares de las células LLC[45, 66]. (Ver anexo 6)

El papel de la expresión de AID

La enzima AID es la única molécula indispensable para la iniciación de los procesos de hipermutación somática (HMS) y de cambio de clase (CC). A pesar de que el mecanismo de acción de esta enzima no ha sido dilucidado en su totalidad, se acepta mayormente que AID actúa sobre el ADN simple hebra generando mutaciones puntuales por deaminación de citidinas en los genes de inmunoglobulinas que se están transcribiendo[81].

Como es de esperar, una enzima capaz de mutar el ADN debe estar altamente controlada y esta regulación se da a varios niveles[82]. La pérdida de alguno o varios de estos mecanismos de control podrían, en un determinado ambiente celular, convertir a la enzima AID en un activo agente mutagénico, por lo que, la enzima AID ha sido relacionada con el origen de muchos síndromes linfoproliferativos[83].

Específicamente en la LLC la alta expresión de la AID en sangre periférica y un CC activo podría explicar una enfermedad más agresiva en pacientes LLC con IgVH no mutada[8].

Debido a que la expresión AID resulta de la interacción con el microambiente tisular activado, se especuló sobre la idea de que si el pequeño subgrupo de células tumorales con CC eran responsable de los altos niveles de expresión de AID y podría derivar de este microambiente particular.

En el estudio de Palacios et al. se analizó la expresión AID en células B de LLC, se compararon los niveles de expresión de AID entre muestras de amígdalas, línea celular Daudi, y LLC-B estimulados a través CD40L e IL-4. Se asumió que los niveles de expresión de ARNm AID después de CD40L/IL-4 de activación son comparables a las de las células B en un microambiente activado[84]. En el estudio antes mencionado, se encontró que el 80% de los pacientes con enfermedad no mutada expresan transcritos de AID, mientras que en la población mutada esto sólo ocurre en el 28%[85].

La alta expresión de AID se limita casi exclusivamente a la subpoblación de células B tumorales que tienen un proceso de HMS activo. Además se demostró que la subpoblación con altos niveles de AID y HMS en curso muestra un mayor potencial proliferativo[86]. Debido a que AID es la principal enzima implicada en la HMS, que se produce en los centros germinales (GC), se determinó la relación entre la expresión de AID con diferentes marcadores de proliferación antiapoptóticos y de activación como Ki-67, Bcl-2, y c-myc, respectivamente, en las 3 subpoblaciones tumorales (IgM⁺, IgG⁺ e IgM⁺/ IgG⁺), en conjunto a la subexpresión del inhibidor del ciclo celular p27kip-1[8]. Estas exhiben un perfil fenotípico activado que contiene células B de LLC con aumento de potencial proliferativo y antiapoptótico, estrechamente relacionado con un curso agresivo de la enfermedad[8].

Algunos informes sugieren que las moléculas CD38 y CD49d son factores pronósticos negativos en la LLC y podrían estar implicados en la interacción molecular entre las células malignas del complejo B y su microambiente [87, 88]. Debido a que la presencia de este subconjunto molecular está claramente asociada con mal pronóstico, podría tener un papel coadyuvante en el mantenimiento de la serie proliferativa de LLC[8].

VII. Discusión:

Al presente, uno de los objetivos de la comunidad hematológica es proporcionar una explicación molecular para la marcada heterogeneidad clínica de LLC, destacado por el perfil diferencial mutacional.

La visión tradicional ha sido que LLC es una enfermedad que deriva de un defecto inherente en la apoptosis, o muerte celular programada en la que, la proliferación de linfocitos B se acumulan lentamente a causa de esta muerte celular disminuida. Sin embargo, estudios recientes mostraron que la LLC es un proceso dinámico que resulta de las células que proliferan y mueren, a menudo a niveles apreciables. Es evidente que la mayoría, si no todos, los eventos proliferativos se producen en los tejidos en los que las células leucémicas son capaces de explotar las interacciones del microambiente para evitar la apoptosis y para adquirir condiciones de crecimiento tumoral. La AID, enzima restrictora de células B, es inducida principalmente mediante el contacto de las células T y B a través de interacciones CD40/CD40-L y es necesario para la HMS y el proceso de CC. La actividad mutacional de AID identifica a esta enzima como el primer mutador del genoma humano con potencial oncogénico.

La inhibición de la apoptosis puede ocurrir *in vivo* en pseudo folículos observados en los ganglios linfáticos, y en los grupos de células descritas en la MO. Estos incluyen pseudofolículos en estrecho contacto con células B proliferantes y aumento de células T CD4 expresando CD40L, que es necesaria para la expresión AID. Estas células T CD4 activadas podrían ser reclutadas por las células tumorales B a través de la expresión de quimiocinas de células-T tales como la atracción de CCL y CCL22 y/o CCL3 y CCL4. Además de esto, las proteínas CD38 y CD49d parecen tener importantes papeles adicionales al interactuar con nurselike, células estromales y las células endoteliales para completar la ruta de activación dentro de los centros proliferativos. En general, estas observaciones favorecen la opinión de que ciertos subconjuntos celulares en LLC podrían recibir señales de supervivencia de microambientes específicos, aumentando su potencial proliferativo y, por consiguiente asociado con una enfermedad más agresiva.

VIII. Conclusión y Perspectivas:

La relación entre el microambiente y el linfocito B leucémico en la LLC ha demostrado tener un rol importante a la hora de entender su progresión y respuesta al tratamiento. Además en la actualidad se plantea su rol preponderante en la etiología y heterogeneidad clínica de dicha enfermedad. Basado en estas ideas se está realizando un gran esfuerzo en entender e investigar nuevos blancos terapéuticos dirigidos a bloquear las interacciones del microambiente con el clon tumoral, lo que podría llevar a disminuir la resistencia al tratamiento de algunas células y obtener también nuevas y mejores herramientas terapéuticas.

IX. Agradecimientos:

Agradecemos al Dr. Pablo Oppezzo por su colaboración y guía durante la realización del trabajo.

Al Instituto Pasteur de Montevideo por el espacio físico para concretar cada una de las reuniones.

A Mag. Cecilia Abreu Olano por permitirnos presenciar la exposición de su tesis, la cual nos permitió profundizar en otros aspectos de la LLC.

X.Anexos:

1: Mecanismos patogénicos de la LLC[1].

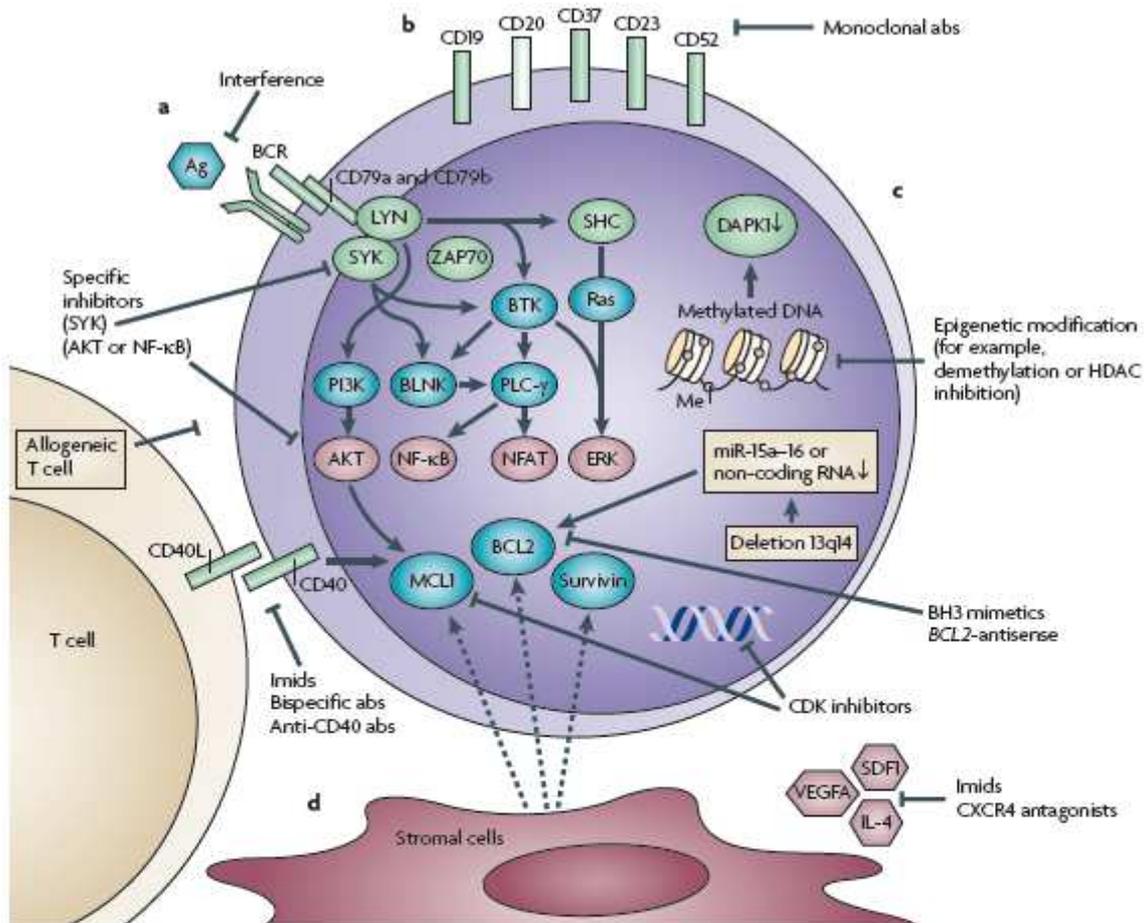


Figure 1 | CLL pathogenic mechanisms and examples of targeted treatment options. a | The B cell receptor (BCR) is composed of two immunoglobulin (Ig) heavy and light chains (variable and constant regions), and CD79a and CD79b, which contain an intracellular activation motif that transmits signals to intracellular tyrosine kinases (for example, SYK and LYN). The ability of these kinases to activate downstream pathways varies in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) subgroups and is correlated with Ig heavy chain variable region (IGHV) mutational status, zeta-associated protein 70 (ZAP70) and CD38 expression^{44,64}. These pathways could be targeted by small molecule inhibitors, the most promising of which might be SYK inhibitors. b | Multiple epitopes on the CLL cell are targets for antibody (ab)-based therapies. c | The most common genetic lesions in CLL include deletion of 13q14 and the downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1, a stress-activated tumour suppressor protein^{18,99}) by DNA methylation¹⁸. miR-15a and miR-16-1 (encoded by genes located on 13q14) have been shown to target BCL2, and may increase its expression in CLL¹⁴³. This pathway can be targeted at multiple levels, including through using small molecule BH3 mimetics¹³⁶. d | Stromal and T cell interactions also contribute to CLL pathogenesis. Although not fully understood, some drugs (immune-modulating drugs; Imids) in use in CLL have been shown to target the interaction with T cells¹⁰⁹. The crosstalk between CLL cells and accessory cells and soluble factors upregulates anti-apoptotic proteins, such as survivin, MCL1 and BCL2 (REFS 103, 105, 106, 144). Ag, antigen; BLNK, B cell linker protein; BTK, Bruton tyrosine kinase; CDK, cyclin-dependent kinase; CXCR4, chemokine receptor 4; HDAC, histone deacetylase; IL-4, interleukin 4; Me, methyl group; NF-κB, nuclear factor-κB; NFAT, nuclear factor of activated T cells; PLC-γ, phospholipase C-γ; SDF1, stromal cell-derived factor 1; VEGFA, vascular endothelial growth factor A.

2-Clasificación de Rai y Binet

| Clasificación | Características | Sobrevida |
|--------------------|---|-----------|
| Rai | | |
| <i>Estadio 0</i> | Linfocitosis en sangre y MO únicamente | 12 años |
| <i>Estadio I</i> | Linfocitosis y linfadenopatía | |
| <i>Estadio II</i> | Linfocitosis y esplenomegalia o hepatomegalia | 7 años |
| <i>Estadio III</i> | Linfocitosis y anemia (Hb <110 g/L) | |
| <i>Estadio IV</i> | Linfocitosis y trombocitopenia (plaquetas <100.10 ⁹ /L) | <1 año |
| Binet | | |
| <i>Estadio A</i> | Menos de 3 sitios infiltrados ¹ , Hb >100 g/L, plaquetas >100.10 ⁹ /L | 9 años |
| <i>Estadio B</i> | 3 o más sitios infiltrados, Hb >100 g/L, plaquetas >100.10 ⁹ /L | 5 años |
| <i>Estadio V</i> | Hb <100 g/L o plaquetas <100.10 ⁹ /L | 2 años |

Tabla 1. Sistemas Rai y Binet de clasificación para los estadios de Leucemia Linfocítica Crónica (LLC). Rai y Binet son los sistemas de clasificación basados en síntomas clínicos más difundidos. Hb: Hemoglobina, MO: médula ósea. ¹sitios infiltrados pueden ser: hígado, bazo y ganglios linfáticos inguinales, axilares y cervicales.

3- Curso clínico de la LLC según el estado mutado/no mutado de genes IgVH.[1]

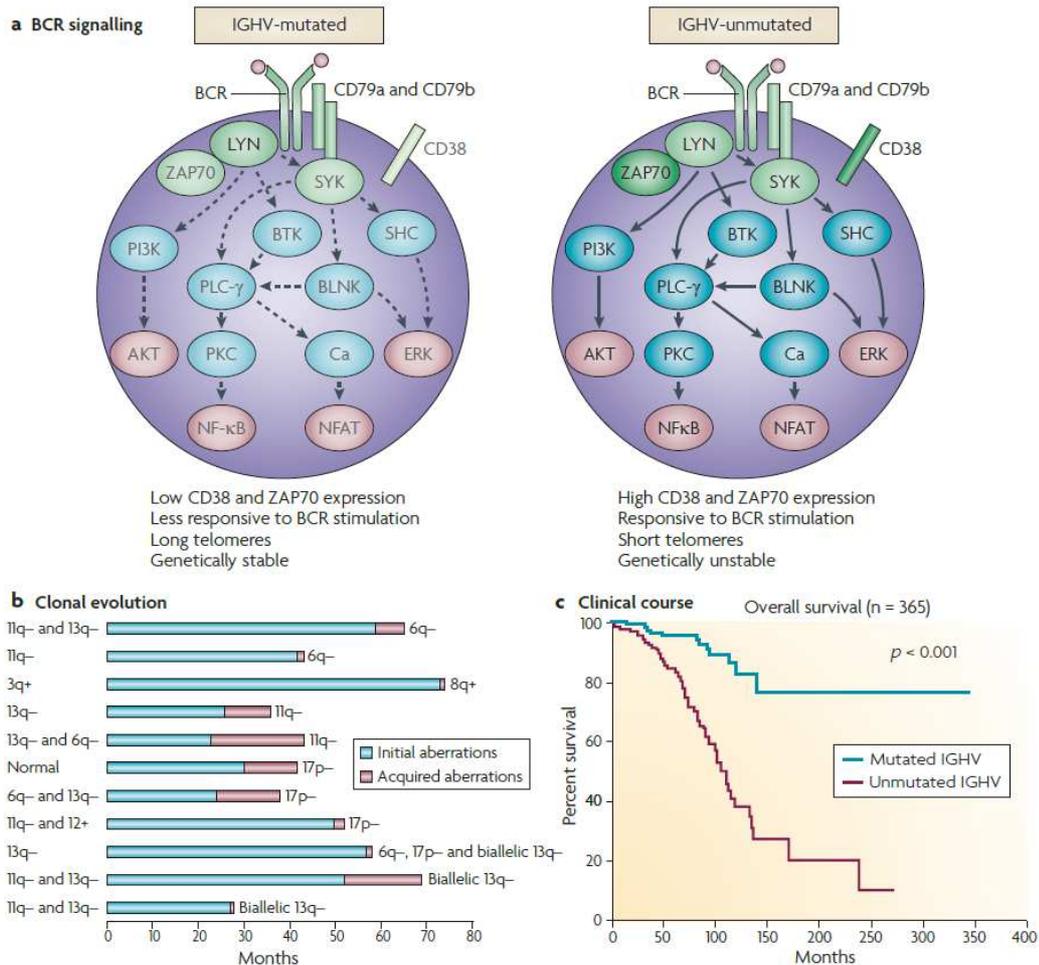


Figure 2 | CLLs with unmutated or mutated IGHV genes show markedly different biological and clinical behaviours. Based on the degree of somatic hypermutation, chronic lymphocytic leukaemias (CLLs) can be differentiated into those with mutated and those with unmutated immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV) genes⁷⁻⁹. The non-random use of IGHV genes and stereotyped B cell receptor (BCR) structures provides evidence for antigenic stimulation and drive. **a** | There are important biological differences between the two groups. IGHV-unmutated CLLs have higher levels of the protein tyrosine kinase zeta-associated protein 70 (ZAP70) and CD38 expression (shown in dark green) than IGHV-mutated CLLs (shown in light green). IGHV-unmutated CLLs activate key signal transduction pathways in response to BCR activation (for example, LYN, SYK, ERK and AKT) and show a different gene expression profile from IGHV-mutated CLLs^{31,32,145}. Reduced signalling in IGHV-mutated CLLs is indicated by grey text and dotted arrows. There is growing evidence that IGHV-unmutated CLLs have significantly greater proliferative capacity than IGHV-mutated CLLs, and that this greater capacity is supported by different telomere lengths^{102,111,146}. **b** | IGHV-unmutated CLLs have a greater likelihood of carrying and acquiring detrimental genetic lesions (11q23 and 17p13 deletion) than IGHV-mutated CLLs^{26,30,35,147}. The duration of the presence of the initial and the acquired aberrations are indicated in blue and red, respectively. Overall, 11 out of 64 patients showed clonal evolution, which was only observed in IGHV-unmutated cases. **c** | These biological differences may explain the different clinical courses associated with IGHV-unmutated and mutated CLLs. In a retrospective cohort from our centre (n = 365), the estimated median survival was not reached for the group with mutated IGHV versus 111 months for the group with unmutated IGHV ($p < 0.001$). These survival data are unpublished but are representative of published data (for example, REFS 26, 140). Part **b** is reproduced, with permission, from REF. 35 © (2007) European Hematology Association and Ferrata Storti Foundation. BLNK, B cell linker protein; BTK, Bruton tyrosine kinase; Ca, calcium; NF- κ B, nuclear factor- κ B; NFAT, nuclear factor of activated T cells; PLC- γ , phospholipase C- γ ; PKC, protein kinase C.

4: Curva de sobrevida en pacientes con genes VH mutados y no mutados[20].

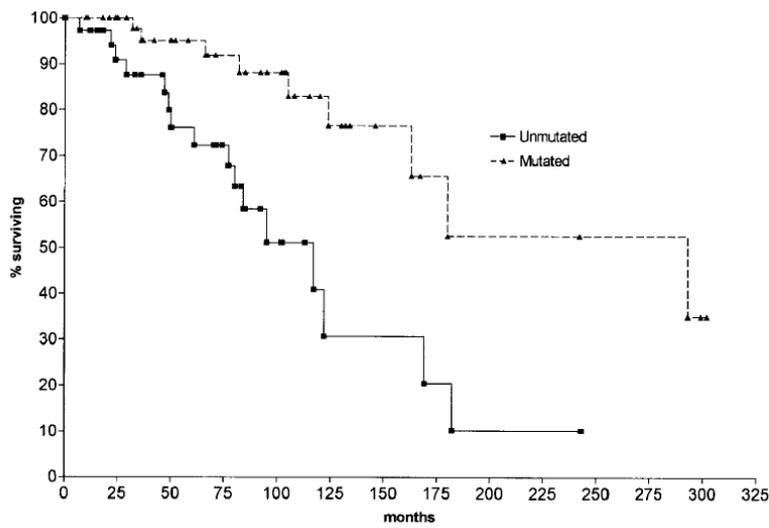


Fig 1. Kaplan-Meier survival curve comparing CLL patients with mutated and unmutated V_H genes. Median survival for unmutated CLL: 117 months; median survival for mutated CLL: 293 months. The difference is significant at the $P = .001$ level (log-rank test).

5- Alteraciones génicas[1].

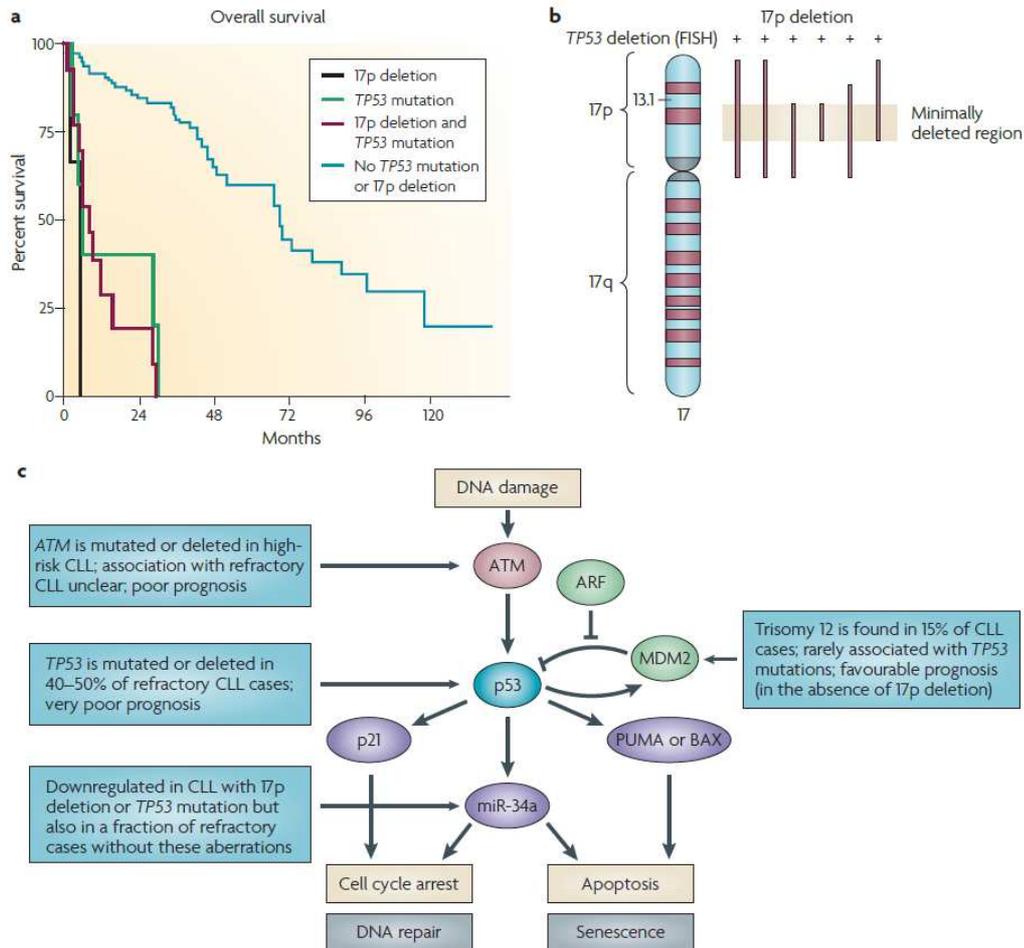


Figure 3 | **TP53 mutations in CLL.** **a** | Comparison of overall survival stratified by the absence or presence of 17p13 deletions and TP53 mutations. Patients with a 17p13 deletion or TP53 mutation have a poor outcome and are therefore prime candidates for experimental strategies with novel agents and stem cell transplantation¹²⁶. **b** | 17p13 deletion is invariably associated with loss of TP53 as confirmed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ('+' denotes a TP53 deletion). The red bars indicate the extent of the 17p13 deletion, which often includes most of the chromosome 17 short arm (data are unpublished but are representative of published results¹⁴⁸). **c** | Multiple genomic aberrations target the p53 pathway in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). The figure shows a simplified schematic of the p53 pathway and response to DNA damage. In the absence of stress, p53 levels are low as p53 levels are partly mediated through the ubiquitin ligase MDM2, which binds to p53 and promotes its degradation. MDM2 is also induced by p53 in a regulatory loop. MDM2 is located on chromosome 12, so CLL cases with trisomy 12 have low p53 levels and favourable overall survival. In response to stress (for example, DNA damage), p53 is activated through various pathways, including ataxia telangiectasia-mutated (ATM). ATM is deleted in approximately 20% of CLL cases and is associated with a poor outcome. TP53 loss or mutation is central to refractory CLL¹⁴⁹. The microRNA miR-34a is associated with p53 defects and refractory CLL¹³⁰. Part **a** is reproduced, with permission, from REF. 23 © (2008) American Society of Hematology. PUMA, p53 upregulated modulator of apoptosis (also known as BBC3).

6- Interacción del linfocito B maligno con células T y sus quimioquinas[51].

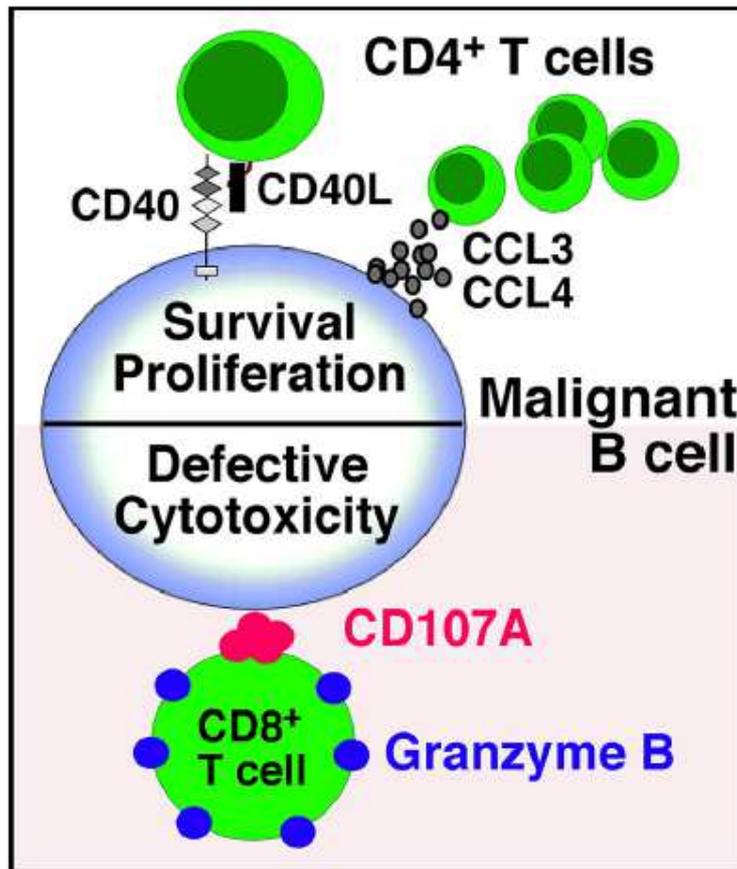


Fig. 2. Interactions between malignant (CLL) B cells and accessory T cells. CLL cells can be activated in proliferation centers via activated, CD154⁺ CD4⁺ T cells [6], which are in intimate contact with proliferating T cells [7]. These T-B cell interactions favor the survival and expansion of the malignant B cells. On the other hand, cytotoxic CD8⁺ T cells from CLL patients have an exhausted phenotype and fail to co-localize Granzyme B with CD107A, a prerequisite for successful establishing immune synapses [41]. Due to this defective cytotoxicity, T cells cannot effectively eliminate CLL cells.

7- Tráfico y homing de células LLC[45].

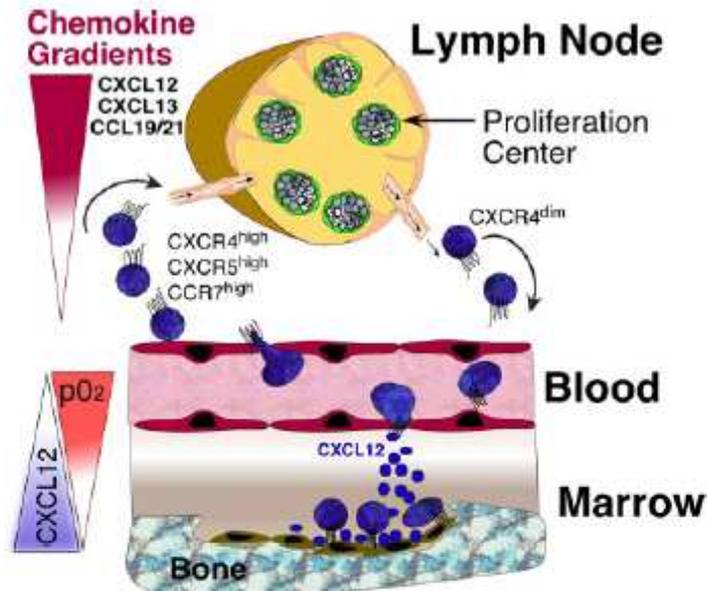


Figure 1. CLL cell trafficking and tissue homing. CLL cells circulate in the peripheral blood, where they become attracted into the lymph nodes and bone marrow by chemokine gradients established by tissue stromal cells. Critical chemokines for lymph node homing are CXCL12, CXCL13, and CCL19/21, which bind to CXCR4, CXCR5, and CCR7 chemokine receptors on CLL cells, respectively. The CXCR4-CXCL12 axis is the predominant factor for marrow homing, and CXCL12 tissue expression is regulated by oxygen tension, as indicated by the triangles. Expression levels of CXCR4 on blood CLL cells can be used to distinguish CLL cells that are on their way into the tissues (CXCR4^{high}) versus CLL cells that recently have exited the tissues (CXCR4^{dim}). CLL adhesion molecules (integrins, selectins, CD44) co-operate with chemokine receptors during tissue homing. Pharmacologic inhibition of these homing mechanisms interferes with 2 distinct events: first, it leads to exit of tissue CLL cells into the blood, causing an increase in lymphocytosis. Second, this also causes inhibition of recirculation of blood CLL cells into the tissues.

8- Quimioquinas y sus receptores[76].

Ann Hematol (2010) 89:437–446

439

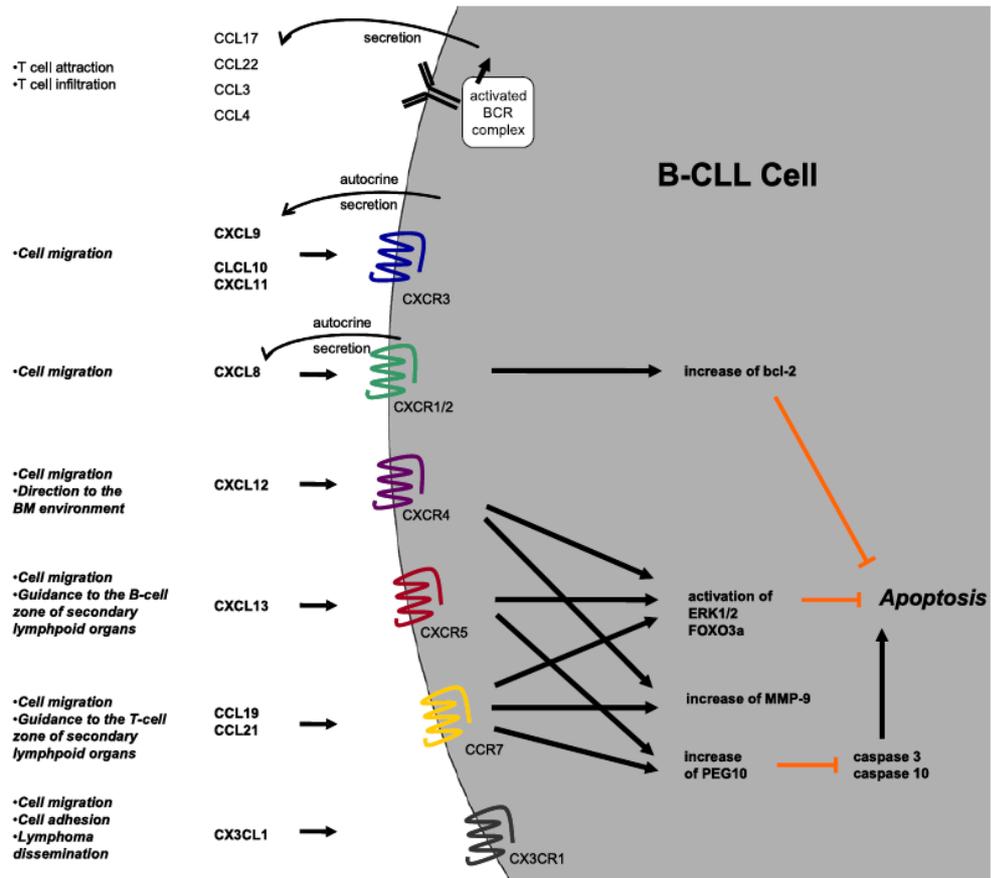
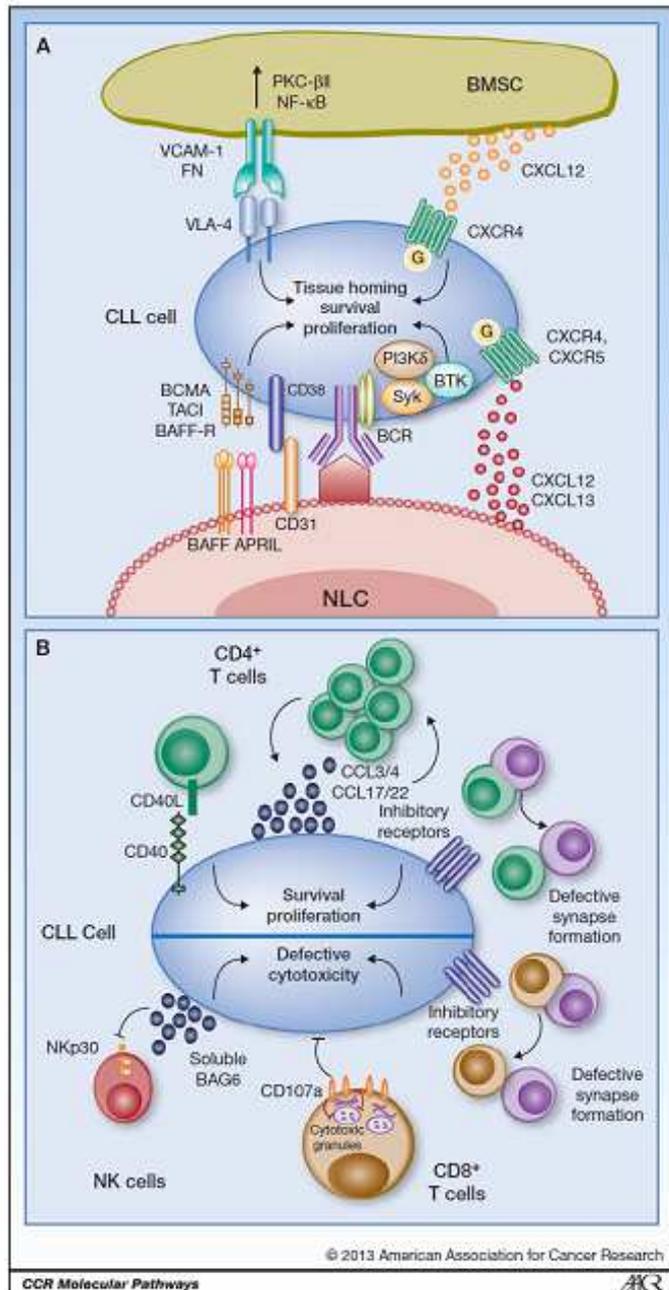


Fig. 1 Chemokines and their receptors known to be involved in B-CLL pathophysiology. CLL cells express the chemokine receptors shown, and the influence their activation has on the cells is shown on both the molecular level and on migration and positioning

9: linfocito B leucémico y su microambiente[80].

Figure 1. The CLL microenvironment. A, in the CLL microenvironment, CLL cells interact with bone marrow stromal cells (BMSC) and NLCs through adhesion molecules and chemokine receptors, expressed on CLL cells. These interactions, in addition to B-cell receptor engagement, promote CLL survival, proliferation, and homing to tissues. B, CD4⁺ T cells are recruited into the tissue microenvironment by CLL cell-derived chemokines, including CCL3 and CCL4, to support CLL cell survival and proliferation. Inhibitory receptors expressed by CLL cells induce defective immune synapse formation between CLL and T cells. Cytotoxic granule secretion by CD8⁺ T cells also is defective, and production of soluble factors by CLL cells suppresses NK cell cytotoxicity, favoring immune evasion of CLL cells.



XII. Bibliografía:

1. Zenz, T., et al., *From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Rev Cancer. 10(1): p. 37-50.
2. Linet, M.S., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis*. Br J Haematol, 2007. 139(5): p. 672-86.
3. Goldin, L.R., et al., *Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database*. Blood, 2004. 104(6): p. 1850-4.
4. Hallek, M., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines*. Blood, 2008. 111(12): p. 5446-56.
5. Chiorazzi, N., K.R. Rai, and M. Ferrarini, *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. 352(8): p. 804-15.
6. Binet, J.L., et al., *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. Cancer, 1981. 48(1): p. 198-206.
7. Rai, K.R., et al., *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1975. 46(2): p. 219-34.
8. Palacios, F., et al., *High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease*. Blood. 115(22): p. 4488-96.
9. Dighiero, G., et al., *Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia*. N Engl J Med, 1998. 338(21): p. 1506-14.
10. Wierda, W.G., et al., *Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment*. J Clin Oncol, 2009. 27(10): p. 1637-43.
11. Dohner, H., et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2000. 343(26): p. 1910-6.
12. Damle, R.N., et al., *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. 94(6): p. 1840-7.
13. Crespo, M., et al., *ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2003. 348(18): p. 1764-75.
14. Zenz, T., et al., *Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up*. Blood, 2008. 112(8): p. 3322-9.
15. Zenz, T., et al., *How little is too much? p53 inactivation: from laboratory cutoff to biological basis of chemotherapy resistance*. Leukemia, 2008. 22(12): p. 2257-8.
16. Dohner, H., et al., *p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias*. Blood, 1995. 85(6): p. 1580-9.

17. el Rouby, S., et al., *p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression*. Blood, 1993. 82(11): p. 3452-9.
18. Schroeder, H.W., Jr. and G. Dighiero, *The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire*. Immunol Today, 1994. 15(6): p. 288-94.
19. Ramsay, A.J., et al., *Next-generation sequencing reveals the secrets of the chronic lymphocytic leukemia genome*. Clin Transl Oncol. 15(1): p. 3-8.
20. Hamblin, T.J., et al., *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. 94(6): p. 1848-54.
21. Wiestner, A., et al., *ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile*. Blood, 2003. 101(12): p. 4944-51.
22. Durig, J., et al., *ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2003. 17(12): p. 2426-34.
23. Hamblin, T.J., et al., *CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease*. Blood, 2002. 99(3): p. 1023-9.
24. Gentile, M., et al., *The prognostic value of CD38 expression in chronic lymphocytic leukaemia patients studied prospectively at diagnosis: a single institute experience*. Br J Haematol, 2005. 130(4): p. 549-57.
25. Abreu, C., et al., *Methylation status regulates lipoprotein lipase expression in chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma. 54(8): p. 1844-8.
26. Brenet, F., et al., *DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing*. PLoS One. 6(1): p. e14524.
27. Kolset, S.O. and M. Salmivirta, *Cell surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism*. Cell Mol Life Sci, 1999. 56(9-10): p. 857-70.
28. Migliazza, A., et al., *Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2001. 97(7): p. 2098-104.
29. Bullrich, F., et al., *Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene*. Cancer Res, 2001. 61(18): p. 6640-8.
30. Seiffert, M., et al., *Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma. 53(6): p. 1023-31.
31. Mockridge, C.I., et al., *Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status*. Blood, 2007. 109(10): p. 4424-31.
32. Austen, B., et al., *Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion*. J Clin Oncol, 2007. 25(34): p. 5448-57.
33. Zenz, T., et al., *miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2009. 113(16): p. 3801-8.
34. Dickinson, J.D., et al., *11q22.3 deletion in B-chronic lymphocytic leukemia is specifically associated with bulky lymphadenopathy and ZAP-70 expression but not reduced expression of adhesion/cell surface receptor molecules*. Leuk Lymphoma, 2006. 47(2): p. 231-44.

35. Mayr, C., et al., *Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2006. 107(2): p. 742-51.
36. Hallek, M., et al., *Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial*. *Lancet*. 376(9747): p. 1164-74.
37. Zenz, T., et al., *TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations*. *Leukemia*. 24(12): p. 2072-9.
38. Ward, B.P., G.J. Tsongalis, and P. Kaur, *MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia*. *Exp Mol Pathol*. 90(2): p. 173-8.
39. Di Ianni, M., et al., *A new genetic lesion in B-CLL: a NOTCH1 PEST domain mutation*. *Br J Haematol*, 2009. 146(6): p. 689-91.
40. Puente, X.S., et al., *Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia*. *Nature*. 475(7354): p. 101-5.
41. Fabbri, G., et al., *Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation*. *J Exp Med*. 208(7): p. 1389-401.
42. Kawagoe, T., et al., *Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2*. *Nat Immunol*, 2008. 9(6): p. 684-91.
43. Chiorazzi, N. and M. Ferrarini, *Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities*. *Blood*. 117(6): p. 1781-91.
44. Messmer, B.T., et al., *In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells*. *J Clin Invest*, 2005. 115(3): p. 755-64.
45. Burger, J.A. and E. Montserrat, *Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling*. *Blood*. 121(9): p. 1501-9.
46. Keating, M.J., et al., *Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2003: p. 153-75.
47. Caligaris-Cappio, F., *Inflammation, the microenvironment and chronic lymphocytic leukemia*. *Haematologica*. 96(3): p. 353-5.
48. Ruan, J., et al., *Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma*. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(19): p. 5622-31.
49. Burger, J.A., et al., *Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1*. *Blood*, 2000. 96(8): p. 2655-63.
50. Ghia, P., et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22*. *Eur J Immunol*, 2002. 32(5): p. 1403-13.
51. Burger, J.A. and J.G. Gribben, *The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies*. *Semin Cancer Biol*. 24: p. 71-81.
52. Stein, H., et al., *Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's lymphomas*. *J Histochem Cytochem*, 1980. 28(8): p. 746-60.
53. Lagneaux, L., et al., *Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells*. *Blood*, 1998. 91(7): p. 2387-96.
54. Ghia, P., et al., *Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005. 294: p. 135-45.

55. Mikaelsson, E., et al., *Fibromodulin, an extracellular matrix protein: characterization of its unique gene and protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2005. 105(12): p. 4828-35.
56. Hartmann, T.N., et al., *Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow*. *Cancer Res*, 2009. 69(7): p. 3121-30.
57. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches*. *Immunity*, 2006. 25(6): p. 977-88.
58. Burger, J.A., M. Burger, and T.J. Kipps, *Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells*. *Blood*, 1999. 94(11): p. 3658-67.
59. Ding, W., et al., *Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch*. *Blood*. 116(16): p. 2984-93.
60. Ame-Thomas, P., et al., *Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis*. *Blood*, 2007. 109(2): p. 693-702.
61. Burkle, A., et al., *Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2007. 110(9): p. 3316-25.
62. Bhattacharya, N., et al., *Non-malignant B cells and chronic lymphocytic leukemia cells induce a pro-survival phenotype in CD14+ cells from peripheral blood*. *Leukemia*. 25(4): p. 722-6.
63. Riches, J.C., et al., *T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production*. *Blood*. 121(9): p. 1612-21.
64. Gorgun, G., et al., *Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells*. *J Clin Invest*, 2005. 115(7): p. 1797-805.
65. Beyer, M., et al., *Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine*. *Blood*, 2005. 106(6): p. 2018-25.
66. Burger, J.A., et al., *High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation*. *Blood*, 2009. 113(13): p. 3050-8.
67. Kay, N.E. and J.M. Zarling, *Impaired natural killer activity in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with a deficiency of azurophilic cytoplasmic granules in putative NK cells*. *Blood*, 1984. 63(2): p. 305-9.
68. Xing, D., et al., *Cord blood natural killer cells exhibit impaired lytic immunological synapse formation that is reversed with IL-2 ex vivo expansion*. *J Immunother*. 33(7): p. 684-96.
69. Palmer, S., et al., *Prognostic importance of T and NK-cells in a consecutive series of newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2008. 141(5): p. 607-14.
70. Bajenoff, M., et al., *Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes*. *Immunity*, 2006. 25(6): p. 989-1001.
71. Okada, T., et al., *Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches*. *J Exp Med*, 2002. 196(1): p. 65-75.

72. Butcher, E.C. and L.J. Picker, *Lymphocyte homing and homeostasis*. Science, 1996. 272(5258): p. 60-6.
73. Moser, B. and P. Loetscher, *Lymphocyte traffic control by chemokines*. Nat Immunol, 2001. 2(2): p. 123-8.
74. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. 76(2): p. 301-14.
75. Campbell, J.J., et al., *Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions*. Science, 1998. 279(5349): p. 381-4.
76. Schrottner, P., M. Leick, and M. Burger, *The role of chemokines in B cell chronic lymphocytic leukaemia: pathophysiological aspects and clinical impact*. Ann Hematol. 89(5): p. 437-46.
77. Burger, M., et al., *Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells*. Blood, 2005. 106(5): p. 1824-30.
78. Ghobrial, I.M., et al., *Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma*. Mayo Clin Proc, 2004. 79(3): p. 318-25.
79. Bennett, F., et al., *B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells show specific changes in membrane protein expression during different stages of cell cycle*. Br J Haematol, 2007. 139(4): p. 600-4.
80. ten Hacken, E. and J.A. Burger, *Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia--focus on the B-cell receptor*. Clin Cancer Res. 20(3): p. 548-56.
81. Bransteitter, R., et al., *First AID (activation-induced cytidine deaminase) is needed to produce high affinity isotype-switched antibodies*. J Biol Chem, 2006. 281(25): p. 16833-6.
82. Lee-Theilen, M., et al., *CtIP promotes microhomology-mediated alternative end joining during class-switch recombination*. Nat Struct Mol Biol. 18(1): p. 75-9.
83. Okazaki, I.M., et al., *Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis*. J Exp Med, 2003. 197(9): p. 1173-81.
84. Guikema, J.E., et al., *Quantitative RT-PCR analysis of activation-induced cytidine deaminase expression in tissue samples from mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia patients*. Blood, 2005. 105(7): p. 2997-8; discussion 2998-9.
85. Heintel, D., et al., *High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia*. Leukemia, 2004. 18(4): p. 756-62.
86. Albesiano, E., et al., *Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone*. Blood, 2003. 102(9): p. 3333-9.
87. Zucchetto, A., et al., *CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival*. Cancer Res, 2009. 69(9): p. 4001-9.
88. Nuckel, H., et al., *High CD49d protein and mRNA expression predicts poor outcome in chronic lymphocytic leukemia*. Clin Immunol, 2009. 131(3): p. 472-80.