

Expresión del marcador pronóstico LPL en la Leucemia Linfoide Crónica

Noé Seija

Orientador: Dr. Pablo Oppezzo

Co-orientador: Mag. Daniel Prieto

**Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica**

**Laboratorio de Investigación en
Leucemia Linfoide Crónica**

**Institut Pasteur de Montevideo
Febrero 2015**



AGRADECIMIENTOS

A mi padre, por formarme como persona, transmitirme sus valores y experiencias y de esa manera sentar las bases del hombre que soy. Por impulsarme a nunca dejarme vencer por las adversidades y creer en mí mismo, así como también por transmitirme la convicción de que toda vida tiene un propósito y que vale la pena sacrificarse y esforzarse hasta encontrar el de uno.

A Cecilia, por significar un antes y un después en mi vida, por ser mi compañera en todo momento y en cada decisión haciendo que todo sea más fácil, y por estar dispuesta a crecer y vivir junto a mí, sin importar los desafíos que se nos presenten.

A Pablo, por abrirme las puertas de su laboratorio e iniciar así una nueva etapa de mi vida, permitiéndome no solo realizar este trabajo sino hacer posible el anhelo de algún día formarme como investigador; y por enseñarme que en este país es posible hacer ciencia de primer nivel, en base a esfuerzo, tesón y dedicación.

A Daniel, por ser mi guía en mis primeros pasos en el laboratorio, por contribuir no solo de forma importante a la realización de este trabajo y a mi formación, sino que también por transmitirme su consejo en distintas vicisitudes que se me han planteado.

A mis amigos, los de la Facultad y los de la vida, que me han acompañado en este proceso de formación, y que a pesar de que el tiempo en ocasiones me haya alejado de algunos me han permitido vivir momentos únicos.

Al grupo del laboratorio, que me demostró el «equipo» de la palabra “equipo” al ayudarme en infinidad de oportunidades, siempre con buena disposición y con compañerismo, permitiéndome así integrarme y sentirme parte del mismo, lo que me reconforta y me impulsa a seguir.

Y a aquellos que en algún momento se cruzaron durante este camino, y que me han permitido mejorar, aprender y madurar a partir de los distintos momentos que he vivido.

A todos... ¡Muchas gracias!



ÍNDICE

ÍNDICE

<u>RESUMEN</u>	6
RESUMEN	7
<u>INTRODUCCIÓN</u>	9
GENERALIDADES SOBRE LA LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA	10
ANORMALIDADES GENÉTICAS EN LA LLC	13
MARCADORES PRONÓSTICO DE LA LLC	15
FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LA LPL	18
LPL COMO MARCADOR PRONÓSTICO EN LA LLC	19
CAUSAS DE LA EXPRESIÓN DE LPL EN LA LLC	20
LPL COMO MARCADOR PROTEICO	22
EL ONCOGÉN TCL1	23
FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE TCL1	24
MODELO TRANSGÉNICO MURINO E μ -TCL1	26
<u>OBJETIVOS</u>	28
OBJETIVOS/OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
<u>METODOLOGÍA</u>	30
SOLUCIONES Y REACTIVOS/PACIENTES/RATONES	31
EXTRACCIÓN DE ARN, DETERMINACIÓN DE SU CONCENTRACIÓN Y PUREZA	32
SÍNTESIS DE ADNC POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA	33
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	34
PCR A TIEMPO REAL (QPCR)	37
CITOMETRÍA DE FLUJO (CF)	41
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	43
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LPL POR QPCR EN PACIENTES CON LLC	44
COMPARACIÓN DE DETECCIÓN DE LPL POR QPCR Y CF	47
EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LPL EN EL MODELO MURINO E μ -TCL1	49
<u>CONCLUSIONES</u>	51
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	52
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	53
BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1.	Diagnóstico diferencial mediante inmunofenotipo de linfocitos B en distintos desórdenes linfoproliferativos, incluyendo la LLC	12
FIGURA 2.	Esquema de algunos de los marcadores pronósticos relacionados con el perfil mutacional de los genes IgV _H	16
FIGURA 3.	Representación esquemática del papel fundamental de la LPL en el metabolismo lipídico	18
FIGURA 4.	Modelo de la activación de AKT mediante interacción con TCL1	24
FIGURA 5.	Esquema de la reacción de PCR	34
FIGURA 6.	Programa de la reacción de PCR	35
FIGURA 7.	Gráficas típicas de qPCR	37
FIGURA 8.	Gráficas de qPCR en escala lineal	38
FIGURA 9.	Curvas de <i>melting</i> representativas de LPL	39
FIGURA 10.	Esquema del programa utilizado para las reacciones de qPCR	40
FIGURA 11.	Curvas de <i>melting</i> obtenidas luego de la reacción de qPCR de pacientes con LLC	44
FIGURA 12.	Niveles de expresión de LPL en pacientes con LLC clasificados en función del perfil mutacional de IgV _H	45
FIGURA 13.	Análisis de expresión de LPL por PCR, qPCR y CF	47
FIGURA 14.	Porcentajes de células LPL ⁺ obtenidos por Citometría de Flujo	48
FIGURA 15.	Análisis de expresión de LPL en ratones transgénicos E μ -TCL1 (TCL1) y <i>littermate</i> (LT) por PCR.	49
TABLA 1.	Resumen de los marcadores pronósticos más relevantes para la LLC	16
TABLA 2.	Secuencia de los <i>primers</i> para GAPDH y LPL utilizados para las reacciones de PCR a tiempo final y PCR a tiempo real	35



RESUMEN

RESUMEN

La Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) es una neoplasia caracterizada por la acumulación lenta y progresiva de linfocitos B clonales en sangre periférica, médula ósea y órganos linfáticos secundarios. Es la leucemia más frecuente en los países occidentales, afectando principalmente a individuos mayores de 50 años. Los pacientes con LLC siguen cursos clínicos muy heterogéneos. Algunos sobreviven durante períodos prolongados sin necesidad de tratamiento definitivo, mientras que otros mueren rápidamente a pesar del tratamiento. La heterogeneidad clínico/molecular que caracteriza a esta neoplasia ha inducido a la búsqueda de marcadores pronósticos que permitan evaluar con certeza la evolución de la enfermedad. Dentro de ellos, uno de los marcadores pronósticos más utilizados es el perfil mutacional en los genes variables de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (IgV_H). Si bien no se conoce su causa, aquellos pacientes con linfocitos B leucémicos que expresan genes IgV_H no mutados (NM) muestran un peor pronóstico que aquellos pacientes en donde el clon leucémico muestra genes IgV_H mutados (MUT). Aunque el marcador mencionado es el de mayor confiabilidad, al momento de realizar un diagnóstico el mismo adolece de practicidad a nivel clínico. Esto ha promovido los intentos por establecer marcadores pronósticos alternativos, capaces de otorgar un diagnóstico preciso con una menor complejidad técnica que la necesaria para evaluar el perfil IgV_H. En el presente estudio se realizó la puesta a punto de la cuantificación relativa de la expresión de un marcador pronóstico para la LLC, la Lipoprotein Lipasa A (LPL), mediante la técnica de PCR a tiempo real (qPCR) en 35 muestras de LLC, así como la detección de dicha proteína mediante citometría de flujo (CF) en 27 muestras. Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa en la expresión de dicho gen a nivel de ARN mensajero (ARNm) entre los pacientes Mutados y No mutados. Por su parte, la evaluación de la expresión de esta proteína muestra la misma tendencia pero dado que hay muy pocos estudios en este campo, más pacientes deben ser estudiados para obtener una conclusión al respecto. Finalmente en este trabajo, también se evaluó el perfil de expresión de LPL en los linfocitos B de sangre periférica (SP) en un modelo murino de LLC (E μ -TCL1) mediante a PCR a tiempo final. Interesantemente y si bien el número de animales debería ser aumentado a fin de sacar una conclusión al respecto, los

resultados sugieren que al igual que en aquellos pacientes que portan genes IgV_H-NM el modelo leucémico μ -TCL1, muestra mayor expresión del gen LPL en comparación con ratones con fenotipo normal (*littermate*).

En resumen, el conjunto de los resultados obtenidos muestra que la evaluación de LPL es uno de los marcadores pronósticos más robustos a nivel de ARN en la LLC, y sugieren que: **a)** la expresión diferencial de LPL a nivel de proteína, podría ser usada como un método alternativo de pronóstico con ventajas técnicas asociadas al método de detección, y **b)** que en el modelo transgénico emulando una LLC con IgV_H-NM, la expresión de LPL está aumentada al igual que lo que ocurre en pacientes NM y progresores que padecen esta leucemia. Estudios adicionales serán necesarios para confirmar y entender la causa de esta expresión diferencial.



INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES SOBRE LA LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA

La Leucemia Linfoide Crónica es una neoplasia caracterizada por la acumulación lenta y progresiva de linfocitos B clonales en sangre periférica, médula ósea y órganos linfáticos secundarios. Es la más frecuente de las leucemias a nivel de los países occidentales, afectando principalmente a individuos mayores de 50 años, con una frecuencia del 25% sobre el total de las leucemias diagnosticadas para dicho hemisferio [1]. La misma presenta una evolución con un curso extremadamente variable, observándose dentro de los pacientes un rango de sobrevida que va desde meses hasta décadas.

La incidencia anual de la LLC varía con la composición étnica de la población estudiada. Mientras que para Estados Unidos se estima una incidencia de 3.5/100.000 habitantes, en el Reino Unido se registran estimaciones de 6/100.000. La edad promedio para el diagnóstico es de 70 para hombres y 74 para mujeres [2]. Recientes estudios realizados en Uruguay y Argentina muestran semejanzas en los porcentajes de la tasa de incidencia de LLC con los de Europa occidental, oscilando para nuestro país en el entorno de 4-5/100.000 habitantes/año en la población adulta (media de edad 72 años, en un rango entre 35-90 años, con una relación aproximada de 2:1 en hombres con respecto a mujeres) [3]. La población caucásica muestra valores claramente mayores de incidencia si se compara con las poblaciones de origen oriental (incluso entre pacientes que emigraron a los Estados Unidos), lo que sugiere una mayor influencia de los factores genéticos sobre los ambientales en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, la naturaleza de esta predisposición genética aún no ha sido esclarecida [1].

A pesar de que la forma de herencia aún se desconoce, se ha determinado que los parientes de primer grado relativos al paciente con LLC son tres veces más propensos a padecer LLC o alguna otra neoplasia linfoide que la población en general [4]. En consonancia con lo anterior, Rawstron y colaboradores observaron que el 3.5% de los individuos normales a los 40 años poseen una población de linfocitos monoclonales con las características de las células del LLC, mientras que en los parientes cercanos a individuos con LLC dicho porcentaje se encuentra entre el 13.5-18%. En función de lo antedicho, la asociación entre la subclínica de la LLC y la propia enfermedad es un tema de intensa investigación [5].

Los progresos obtenidos en lo que refiere al tratamiento de la enfermedad han permitido obtener con frecuencia la remisión de la misma, sin embargo, la mayoría de los pacientes experimentan una recaída, por lo que se ha llegado al consenso de que la enfermedad todavía permanece incurable [1].

La gran heterogeneidad clínico/molecular de esta leucemia ha llevado a la generación de lo que se conoce como la hipótesis de los tres tercios en donde se separan a los pacientes con LLC de la siguiente manera: **a)** los pacientes con una enfermedad indolente y estable que nunca requerirán de tratamiento, **b)** los pacientes en los que la enfermedad progresará lentamente hacia una enfermedad más agresiva y **c)** los pacientes que presentan una enfermedad agresiva y requieren de tratamiento desde el inicio.

Durante mucho tiempo se consideró que a pesar de las diferencias clínicas, la enfermedad se caracterizaba por un proceso indolente de acumulación de linfocitos tumorales a nivel de la SP en donde casi no existía la proliferación tumoral. Sin embargo, la profundización de los conocimientos moleculares sobre la enfermedad han permitido determinar que las diferencias entre estos tres tercios está asociada a un delicado equilibrio entre poblaciones quiescentes y proliferantes del mismo clon leucémico en el mismo paciente [6]. Al presente, diferentes poblaciones proliferantes han sido descritas [7]–[9] y a pesar de que no existe aún un acuerdo general acerca de su fenotipo, es claro que dicha población puede duplicarse activamente mostrando además expresión de proteínas asociadas a la proliferación y la agresividad tumoral [7].

Por tanto, en el campo de la biología de la LLC surge como uno de los mayores desafíos el de caracterizar esta población proliferante y encontrar cuáles son sus orígenes para así poder generar nuevas herramientas terapéuticas dirigidas a frenar la evolución leucémica.

En lo que refiere al diagnóstico de la enfermedad, en la mayoría de los casos la misma es detectada en ausencia de sintomatología con motivo de un hemograma de rutina. Para su diagnóstico clínico es necesario que el paciente presente una linfocitosis absoluta de al menos $5 \times 10^9/L$ (5000/ μL) de linfocitos maduros en sangre y un inmunofenotipo característico de los linfocitos B. Los mismos son pequeños, con un citoplasma estrecho, un núcleo denso con su cromatina parcialmente agregada y sin un nucléolo distinguible [10], mientras que el inmunofenotipo que los define se muestra en la **Figura 1**.

Las características mencionadas son en general suficientes para un diagnóstico preciso de la LLC, permitiendo distinguirla de otros desórdenes linfoproliferativos como leucemia prolinfocítica, leucemia de células pilosas, linfoma de células del manto y otros linfomas que pueden parecerse a la LLC [11]–[13].

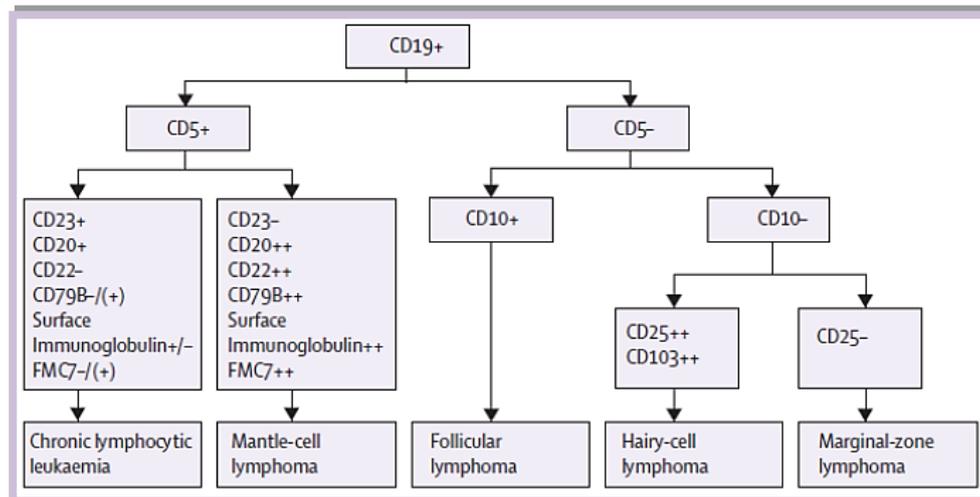


Figura 1- Diagnóstico diferencial mediante inmunofenotipo de linfocitos B en distintos desórdenes linfoproliferativos, incluyendo la LLC. Figura tomada de [1].

En lo pertinente a la clasificación anatómico-clínica de la LLC, figuran dos criterios de mayor aceptación y utilización, el propuesto por Binet en 1977 [14] que clasifica a los pacientes en tres categorías en función de su pronóstico: bueno, intermedio y severo (estadio A, B y C, respectivamente).

La otra clasificación comúnmente utilizada, es la elaborada por Rai y col. [15], en la que en lugar de tres categorías se tienen en cuenta cinco (0, I, II, III y IV).

Naturalmente se desprende, que ambas clasificaciones tienen asociadas una sobrevida del paciente según el estadio en el que se encuentre el mismo, es así que para los pacientes en estadio de Binet A o de Rai 0 la sobrevida media es mayor a los 10 años, mientras que para los estadios de Binet B o Rai I-II la misma pasa a encontrarse entre los 5-7 años y por último para los estadios de Binet C o Rai III-IV se reduce aún más, encontrándose entre 1 y 3 años [16].

ANORMALIDADES GENÉTICAS EN LA LLC

Si bien las clasificaciones de Binet o de Rai son útiles desde el punto de vista clínico, permitiendo la selección de las estrategias terapéuticas más indicadas, no son capaces de prever si los pacientes pueden evolucionar desde niveles de riesgo bajo o intermedio, ni tampoco la forma en cómo lo harán, y es entonces que surge la necesidad de contar con marcadores pronósticos que permitan determinar cuándo un paciente presentará una LLC indolente o cuándo progresará.

Como se mencionara anteriormente, la naturaleza de la predisposición genética aún no ha sido resuelta, en este sentido, ninguna de las aberraciones cromosómicas reportadas es constante y hasta el momento no se ha determinado si constituyen eventos iniciales o las mismas ocurren durante la evolución [2].

En contraste con lo que se observa para otras patologías que involucran a los linfocitos B, en las que normalmente se encuentran translocaciones cromosómicas balanceadas, para la LLC lo más frecuente es encontrar mutaciones, deleciones o trisomías. En estudios realizados mediante hibridación fluorescente in situ (*FISH*) por Döhner y colaboradores [17], en un conjunto de 325 pacientes con LLC se logró detectar en el 82% de los casos la presencia de aberraciones cromosómicas. En dichas condiciones se encontró que la más recurrente fue la deleción 13q (55%) seguida por la deleción 11q (18%), la trisomía 12q (16%) y la deleción 17p (7%). A su vez, es posible asociar dichas aberraciones a una diferente evolución clínica, estableciendo para ello un modelo jerarquizado de riesgo citogenético, en dónde entre las de mayor riesgo se encuentran las deleciones 17p y 11q.

Poco es lo que se sabe acerca de las correlaciones moleculares con las alteraciones mencionadas; para el caso de la deleción 11q, ésta involucra al gen mutado de la Ataxia Telangiectasia (ATM) [18] el cual codifica para una serina-treonina-quinasa que se activa ante daños en el ADN (rotura de doble cadena), fosforilando a varias proteínas que conducen a la detención del ciclo celular, reparación del daño e incluso a apoptosis; entre dichos blancos se encuentra el supresor de tumores p53, que cumple un rol esencial para mantener la integridad del genoma, favoreciendo su reparación y regulando el ciclo celular así como también induciendo la apoptosis.

Por lo tanto su afectación trae aparejado consigo una inestabilidad en el genoma al impedir la correcta reparación de los daños en el ADN, la pérdida del control del ciclo

celular y pérdida de función de p53, lo que favorece la acumulación de mutaciones, proceso que sin duda contribuye a la patogénesis de la LLC. En este sentido, la presencia de ésta y otra delección, (la 17p, región que codifica para el gen de p53) se encuentran asociadas a un mal pronóstico, predominando entre los estados más avanzados de la enfermedad y entre pacientes con los genes IgV_H no mutados. Así como también una mayor resistencia al tratamiento puesto que muchas de las drogas citotóxicas requieren que la vía de p53 se encuentre intacta para ser efectivas [19], [20].

Por el contrario la aberración vista con más frecuencia en la LLC, (más del 50 %) es la delección 13q vinculada a un buen pronóstico, y a los genes IgV_H mutados. Dicha delección se encuentra de forma monoalélica en el 76% de los casos y bialélica en el 24% [17], [21], [22] y abarca a la región que contiene al ARN largo no codificante suprimido en la leucemia (DLEU-2) y el primer exón del gen DLEU1 [23], [24]. Se ha determinado que dentro de dicha región se encuentran dos microARN (miR-15a y miR-16-1) [25], [26]; los cuales se cree que pueden presentar una función supresora de tumores regulando la expresión de la proteína antiapoptótica BCL-2 [27].

Por último, en lo que refiere a la trisomía 12q, sus implicancias patogénicas en la LLC aún no han sido del todo dilucidadas, sin embargo, se ha propuesto por algunos autores que dicha trisomía podría ocasionar una elevada dosis genética de un posible proto-oncogén (CLLU1) [28].

MARCADORES PRONÓSTICOS DE LA LLC

La búsqueda de marcadores pronósticos de la LLC que permitan evaluar con certeza la evolución de la enfermedad así como también optar por la terapia más efectiva y menos agresiva es uno de los desafíos de la comunidad científica.

En este sentido hubo un gran avance en la temática cuando con los estudios de Schroeder y Dighiero en 1994 se comenzó a vislumbrar que la LLC se trataba de una enfermedad en la que el proceso tumoral podía originarse tanto en linfocitos B vírgenes como sobre los de memoria [29]. Posteriormente, con los trabajos de Hamblin y col. [30] y Damle y col. [31] en 1999 se lograría demostrar una estrecha relación entre el perfil mutacional de los genes de las inmunoglobulinas con el pronóstico de la enfermedad como ha sido descrito previamente.

A partir de ese entonces esta característica surge como el principal método pronóstico para LLC por lo que refiere a la confiabilidad de su resultado, sin embargo el análisis del perfil mutacional de la región IgV_H del clon tumoral supone un conjunto de etapas y técnicas complejas, como ser extracción del ARN mensajero, producción de ADNc por transcripción reversa a partir de éste, amplificación mediante PCR, clonado y secuenciación, que a su vez requieren equipamientos e instalaciones especializadas que no son de acceso general para todos los centros hematológicos hospitalarios [32].

De esta dificultad práctica se desprende la búsqueda de nuevos marcadores moleculares cuyo carácter predictor de la evolución de la LLC sea tan eficiente como el análisis de los genes IgV_H , pero sus requerimientos de obtención sean más simples y por lo tanto representen una alternativa aplicable a nivel clínico.

Con este propósito varios estudios se han dedicado a indagar en la expresión génica diferencial entre linfocitos B normales y leucémicos (tanto MUT como NM) y de esa manera obtener moléculas candidatas para marcadores pronósticos de la LLC [33]–[35]. Ello ha redundado en el descubrimiento de un conjunto de moléculas que en la **Figura 2** pueden verse asociadas con el perfil mutacional de los genes IgV_H , con la intención de establecer mecanismos moleculares que expliquen en parte la diferente evolución de la enfermedad [36].

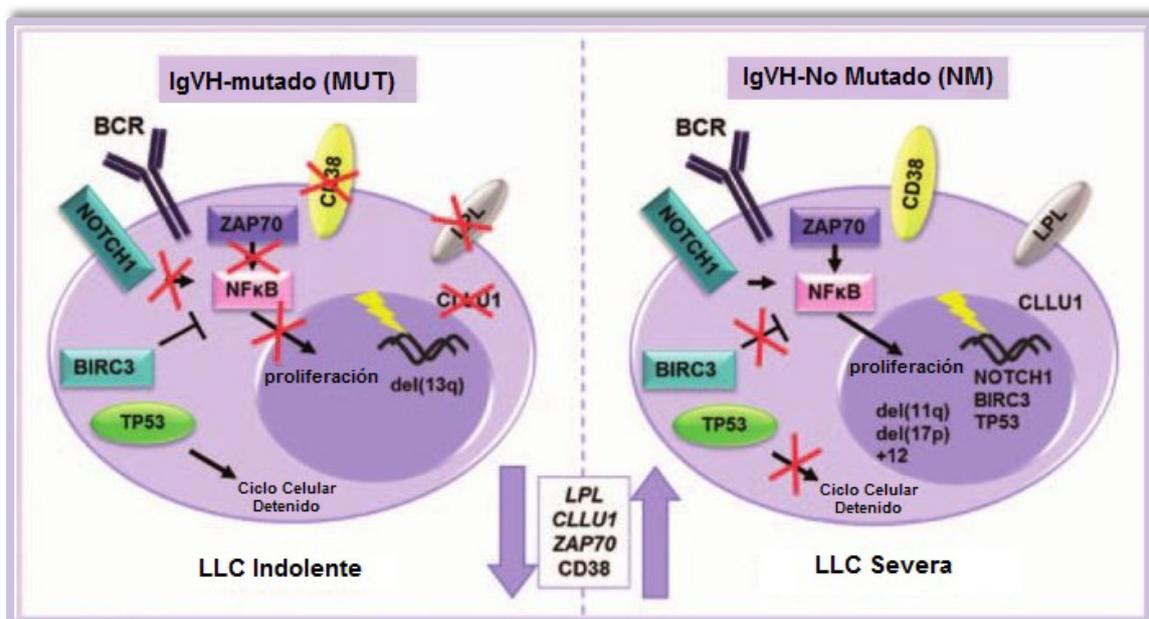


Figura 2- Esquema de algunos de los marcadores pronósticos relacionados con el perfil mutacional de los genes IgV_H . Tanto las mutaciones activadoras en NOTCH1 como las supresoras de función en BIRC3 conducen a potenciar la vía de señalización NFκB y de esa manera inducir la proliferación de las células B de pacientes con LLC. Por otro lado ZAP70 está involucrado en la vía de señalización del BCR (Receptor de células B) y su sobreexpresión potencia a su vez la proliferación por NFκB; a su vez la supresión de TP53 por deleciones o mutaciones en los NM produce un aumento de la sobrevida celular. Por otro lado, existe una sobreexpresión de LPL y CLLU1 en pacientes con mal pronóstico, que en los últimos años han demostrado ser buenos marcadores pronósticos por asociarse a una mala evolución clínica. Figura tomada de [36].

A continuación se detallan en la **Tabla 1** los principales marcadores pronósticos para la LLC hasta el momento.

Tabla 1- Resumen de los marcadores pronósticos más relevantes y validados para la LLC.

Marcadores clásicos	Marcadores proteicos	Marcadores ARN	Marcadores ADN
Estadios clínicos de Rai y Binet	En Suero:	Estado mutacional IgV_H	Cítogenética (FISH)
	Timidina Kinasa (TK)		
Morfología y nivel de linfocitos en SP	β-2 Microglobulina	Expresión de Lipoprotein	Largo de telómeros y actividad telomerasa
	CD3 soluble	Lipasa A (LPL)	
Tiempo de duplicación de linfocitosis	VEGF	Expresión de ADAM29	
	En Linfocito B:	Relación ADAM29/LPL	
	Expresión de CD38	Expresión de AID	
	Expresión de Zap-70	Expresión de CLLU1	
	Expresión de CD49d	Patrones de microARN	
	Expresión de TCL-1		
	Expresión de MCL-1		

Entre los marcadores mostrados en la **Tabla 1**, los más empleados para la evaluación del pronóstico de la LLC (además del perfil mutacional de los genes IgV_H) son tres: el estudio de las anomalías cromosómicas, la expresión de la glicoproteína de transmembrana CD38 y de la proteína Zap-70 (de la familia de Syk/Zap-70 proteínas kinasas) en el linfocito B leucémico [37]. El primero como se mencionó se realiza mediante la técnica de *FISH*, mientras que en lo que respecta al estudio de CD38 y Zap-70 se realizan principalmente a través de citometría de flujo, lo que posibilita su aplicación en centros hematológicos. Lamentablemente, ambos marcadores pronósticos han presentado problemas serios al momento de estandarizar la técnica a nivel mundial lo cual ha impedido su diseminación [38], [39].

En la actualidad, el consenso es que para definir la estrategia terapéutica para un paciente con LLC, es necesario reunir la mayor cantidad de información posible, tanto desde el punto de vista clínico como también por medio de los distintos marcadores pronóstico (perfil mutacional IgV_H , CD38, Zap-70, *FISH*) dada la falta de un único marcador que indique con seguridad el tratamiento a seguir [1].

Dentro de los marcadores de ARN resumidos en la **Tabla 1**, el que mejor se correlaciona con el perfil de genes de IgV_H y que mejor parece predecir la evolución clínica es la Lipoproteína Lipasa A (LPL). El descubrimiento de este gen surge a partir de un estudio comparativo realizado por la técnica de microarreglos (*microarray*) de la expresión génica entre dos grupos de pacientes con LLC: a) pacientes con IgV_H -MUT y buena progresión; y b) pacientes con IgV_H -NM y mala progresión [35]. De dicho estudio se obtuvieron un conjunto de genes expresados de forma diferencial entre los dos grupos y que luego de ser validados por PCR a tiempo real resultó en la selección de un candidato para cada grupo; en particular LPL mostró ser el de mayor expresión en el grupo de los IgV_H -NM [40] y posteriormente otros estudios mostraron la gran importancia de la evaluación de este gen en la predicción de la evolución clínica de esta leucemia [41], [42].

FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LA LPL

El gen de LPL codifica para una enzima del metabolismo lipídico que se produce en el tejido muscular, tejido adiposo y en macrófagos. La función fisiológica de la misma consiste en la hidrólisis de triacilglicéridos de las lipoproteínas ricas en éstos, en especial quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (*VLDL*), y así de este modo producir ácidos grasos que serán incorporados por los distintos tejidos para su posterior utilización o almacenamiento.

Como resultado de su acción en las lipoproteínas, se producen partículas remanentes las cuales son incorporadas dentro de las lipoproteínas de alta densidad (*HDL*). La LPL ejerce su principal función en el endotelio capilar donde se une a proteoglicanos sulfatados quedando así sobresaliente al torrente sanguíneo en donde interacciona con sus lipoproteínas sustrato y con su activador, la apolipoproteína C-II [43], [44] (**Figura 3**). A su vez, es importante señalar que mutaciones en el gen de LPL se asocian frecuentemente a deslipidemia y aterosclerosis[45], [46]

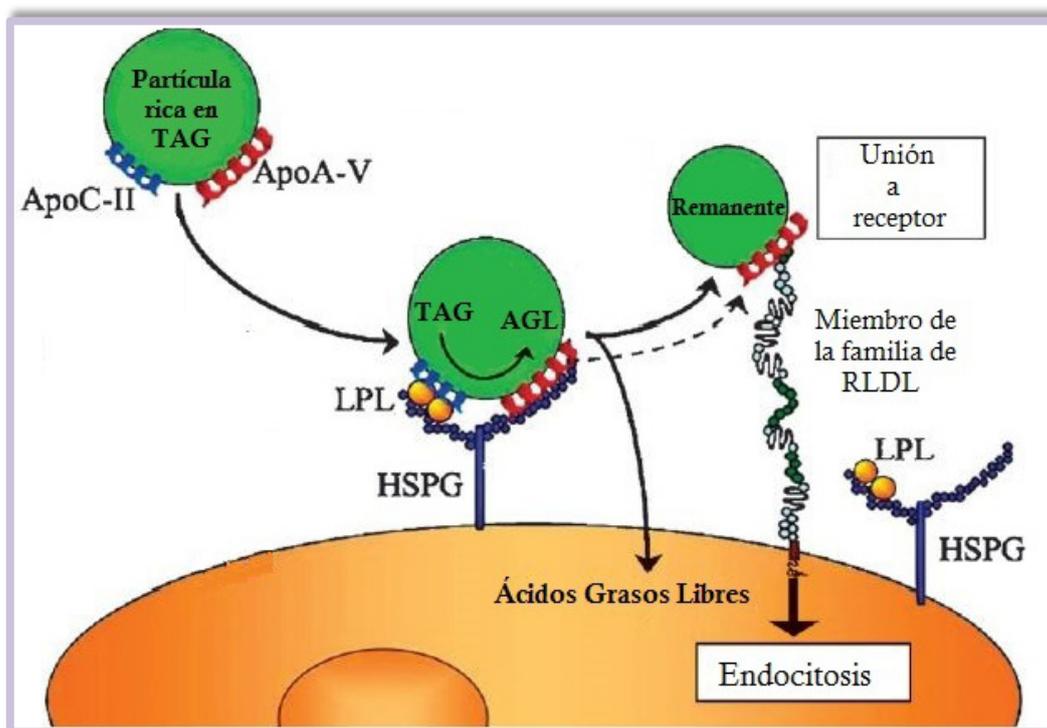


Figura 3- Representación esquemática del papel fundamental de la LPL en el metabolismo lipídico. En la figura puede observarse a la LPL presente en la superficie celular, asociada a HSPG (Proteoglicanos con heparán sulfato). La LPL es capaz de activarse gracias a ApoC-II y así hidrolizar los triacilglicéridos (TAG) de los quilomicrones o VLDL, para de esa manera producir ácidos grasos libres (AGL) utilizables por los distintos tejidos (adiposo, cardíaco y muscular). Figura adaptada de [60].

LPL COMO MARCADOR PRONÓSTICO EN LA LLC

Retomando lo observado en el estudio donde se aislara a LPL como el gen más sobreexpresado dentro de los pacientes con IgV_H-NM, también se seleccionó en el mismo sentido a ADAM29 en el grupo de los IgV_H-MUT y con buena progresión [40]. Éste último codifica para una proteína que forma parte de la familia de las desintegrinas y metaloproteasas, moléculas de transmembrana que se encuentran implicadas en interacciones intercelulares o con la matriz así como también en el desprendimiento de moléculas de la superficie celular [47], [48]; siendo ADAM29 únicamente expresada en tejido testicular [49].

A pesar de ello y como se mencionara con anterioridad aún se desconoce de qué manera se establece el vínculo que presentan tanto LPL como ADAM29 con la progresión de la LLC, ya que hasta el momento no se reporta su expresión en linfocitos B con un rol fisiológico [40].

La evaluación de la capacidad para predecir la evolución clínica de los dos marcadores realizado por Oppezzo y col. fue efectuado sobre un total de 127 pacientes con LLC, utilizando para ello la proporción entre la expresión de ambos genes LPL/ADAM29 (L/A) comparándola con la expresión de otro marcador pronóstico (ZAP70) y con el perfil mutacional de los genes IgV_H [34], [50]. Obteniéndose que para todos los pacientes con un estadio de Binet A, los tres marcadores fueron capaces de predecir una supervivencia libre de eventos, mientras que para los pacientes en estadios B y C, únicamente el cociente L/A fue el que se correlacionó de forma significativa con la sobrevida; IgV_H cobró valor solamente después de ajustar el análisis al sexo y la edad, mientras que ZAP70 por sí solo no tuvo valor pronóstico para los estadios mencionados.

A su vez, gracias a la obtención de resultados concordantes la utilización de la proporción L/A y de la expresión de ZAP70 les permitió obtener con gran exactitud (99%) el perfil mutacional IgV_H en el 80% de los casos. Cabe señalar, que la cuantificación de la expresión de LPL y ADAM29 fue determinada por un método alternativo, la técnica de RT-PCR multiplex, que logra amplificar y estudiar ambos genes a la vez, permitiendo obtener un diagnóstico más rápido, reproducible y simple. Sin embargo, y a pesar de que esto fuera confirmado por varios estudios posteriores [51]–[55] su aplicación a nivel hospitalario no ha podido concretarse como se esperaba, probablemente debido a la complejidad técnica necesaria para llevar a cabo el estudio.

CAUSAS DE LA EXPRESIÓN DE LPL EN LA LLC

A pesar de la utilidad que presenta la Lipoprotein Lipasa A en el diagnóstico de la enfermedad, permanecen sin resolver algunas cuestiones fundamentales como el rol funcional de la misma en el linfocito B y los mecanismos moleculares que regulan su expresión.

Estas cuestiones tuvieron un importante avance con el estudio realizado por Moreno y col. [56]. Dicho estudio se basa en evidencias previas que revelan que durante el desarrollo normal de los linfocitos, la regulación de la expresión génica es realizada mediante cambios en la estructura de la cromatina y/o a través de los patrones de metilación de las islas CpG, en este sentido, se ha reportado que cambios en los patrones de metilación de los residuos de citosina que son específicos de tejidos, pueden resultar alterados por factores del ambiente, los cuales se vinculan frecuentemente a desórdenes propios del proceso tumoral [57], [58].

Por lo tanto, en el trabajo en cuestión se analizó el patrón de metilación de las islas CpG para un total de 26 pacientes con LLC (14 con IgV_H NM/LPL⁺ y 12 con IgV_H MUT/LPL⁻) relacionando el mismo a la expresión de LPL. Los resultados indicaron una correlación significativa entre la expresión de LPL y un estado de desmetilación en pacientes NM y viceversa, entre la ausencia de expresión de LPL y un estado metilado en pacientes MUT. Es oportuno señalar que las desmetilaciones observadas se situaron en la región comprendida entre el exón 1 y el intrón del gen de LPL.

A su vez, como estudios previos sugieren que la activación del metabolismo lipídico (degradación de ácidos grasos) se encuentra relacionado con una alta expresión de LPL en pacientes NM con una LLC progresiva [59], Moreno y col. investigaron si dicha sobreexpresión podría vincularse a señales del microambiente sobre la célula leucémica. En consecuencia, observaron que la activación mediante CD40/IL-4 fue capaz de inducir una expresión alta de LPL y que la misma tenía asociado un proceso de desmetilación del ADN como también una proliferación del clon tumoral. Efectos similares pero en menor medida se observaron para la estimulación con BCR, pero no así con TLR (Receptores tipo-Toll).

En conjunto, estos resultados muestran un vínculo entre la proliferación del clon tumoral con el proceso de desmetilación de las islas CpG del gen de LPL y a su vez, sugieren que este proceso epigenético podría desencadenarse por señales específicas de proliferación provenientes del microambiente ocasionadas por CD40/IL-4 y BCR, pero no así por señales T-independientes inducidas a través de los TLR.

En suma de todo lo antedicho, es posible deducir que la expresión específica y anormal de LPL puede además de constituir un factor de pronóstico de la LLC, brindar una estrategia para comprender el comportamiento tan heterogéneo de esta enfermedad, ya que como se describiera previamente (**Figura 3**) la LPL cumple una función de puente para la formación de complejos moleculares (lipoproteína-LPL-HSPG) [60]; esta característica podría quizás relacionarse con la capacidad migratoria del subconjunto de células leucémicas proliferantes que de ser así, la LPL podría actuar de forma similar a un factor de intercambio, facilitando las interacciones con las células circundantes de los distintos microambientes en los tejidos, como por ejemplo células estromales o células dendríticas foliculares, entre otras [56].

En este sentido, se reportan otros estudios en donde se ratifica el concepto de que el metabolismo lipídico y la actividad de las lipasas resultarían funcionalmente relevantes para la patogénesis y progresión de la enfermedad, al observar que ante el tratamiento de los linfocitos B con un inhibidor de lipasas, la resistencia de éstos a la apoptosis desaparece e incluso resulta en una inducción de la misma, así como también en una respuesta más efectiva a la acción de fármacos [61].

LPL COMO MARCADOR PROTEICO

Como se describiera previamente, es indudable el potencial como marcador pronóstico que posee el nivel de la expresión de LPL para la LLC en las células leucémicas. Incluso, en estudios realizados por Kaderi y colaboradores, se observa que entre todos los marcadores de ARNm para el pronóstico de la LLC, LPL resulta el marcador más robusto [41].

Sin embargo, el hecho de que su determinación sea a partir del ARNm, supone la utilización de técnicas y equipamiento que no se encuentran en el uso rutinario a nivel de hospital, por más que la técnica de PCR a tiempo real sea más sencilla de aplicar que una determinación del perfil mutacional de los genes IgV_H .

Es por ello, que atendiendo a esta problemática resulta una tarea pendiente la búsqueda de la determinación de LPL a nivel de proteína redundando así en la estandarización de un procedimiento que pueda ser empleado de rutina en la clínica, por ejemplo, a través de la citometría de flujo.

Esta necesidad se fundamenta en dos razones principales:

1) Porque los marcadores proteicos más utilizados hasta el momento para el diagnóstico, CD38 y ZAP70 no han logrado instaurarse como alternativas confiables para dicho procedimiento; CD38 porque entre otras dificultades ha revelado que su expresión es variable en el tiempo de acuerdo al estado de activación del linfocito B [62], [63]; y ZAP70 porque no ha resultado tarea sencilla la generalización de un protocolo único para su detección de rutina a nivel hospitalario[64]–[66];

2) Porque dada la robustez de la expresión de LPL a nivel de ARNm y su correlación con las curvas de supervivencia y tiempo libre de tratamiento, la evaluación de LPL a nivel de proteína podría otorgar a la clínica médica un método de pronóstico más accesible y tan firme como resulta ser la evaluación del nivel de ARNm.

EL ONCOGÉN TCL1

Dentro de otro grupo de desórdenes linfoproliferativos como la Leucemia Linfocítica Crónica de linfocitos T (T-LLC), leucemia prolinfocítica T (T-PLL) y otras leucemias de células T maduras, se ha asociado como principal causal las aberraciones cromosómicas que involucran a la región 14q32. En dicha región es posible determinar la presencia del locus TCL1 (*T cell leukemia/lymphoma*) que contiene el oncogén del mismo nombre que resulta ser blanco de translocaciones e inversiones [67].

Dichas alteraciones presentan como característica más frecuente la formación de rearrreglos del locus de TCL1 con el del TCR (Receptor de células T) $\alpha\gamma$ en 14q11 resultando en inversiones: inv(14)(q11;q32); y translocaciones: t(14)(q11;q32) [67], [68].

La consecuencia de ambos rearrreglos presenta el mismo efecto, esto es, que el locus TCL1 pase a encontrarse subordinado por elementos regulatorios del receptor TCR, haciendo posible la activación del mismo.

El gen de TCL1 fue inicialmente aislado e identificado en 1994, sin embargo, recién en 1999 se completó la caracterización del locus entero, encontrándose dos genes más, TCL1b y MTCP1 [68], [69]. La correcta expresión de la familia de TCL1 es muy importante en la salud del organismo, ya que niveles bajos de TCL1 puede ocasionar efectos perjudiciales en la reproducción y el desarrollo, mientras que niveles altos se asocian como se mencionara, con predisposición al cáncer [70], [71].

La proteína TCL1 se expresa normalmente en embriones tempranos y tejidos fetales así como también en células germinales y linfocitos B y T tempranos. Los niveles altos de expresión de la misma, han sido también asociados a una variedad de tumores derivados de líneas celulares de linfocitos B yendo desde pre-células B hasta células B maduras [72], [73].

Diversos estudios han sido realizados sobre la familia de genes de TCL1 murino situada en el cromosoma 12, que permitieron determinar que en estos roedores el locus TCL1 de 80kb contiene 6 genes: un gen TCL1 y 5 genes TCL1b. En lo que refiere a la proteína TCL1 de ratón propiamente dicha, ésta presenta un 50% de homología con la humana y se expresa en órganos hematopoyéticos fetales y en células B y T inmaduras, así como también en el bazo y timo adultos [68].

FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE TCL1

La función fisiológica de TCL1 permaneció desconocida hasta que en el año 2000 dos trabajos permitieron determinar que la proteína en cuestión actúa como un coactivador de la proteína quinasa AKT (también conocida como PKB) e indirectamente de la vía de NF- κ B [74], [75]. La proteína AKT constituye una reguladora central de diversos procesos celulares en mamíferos, entre ellos la proliferación, inhibición de la apoptosis, regulación del ciclo celular y del tráfico vesicular. Ésta resulta activada por señales recibidas del entorno y como consecuencia fosforila a las proteínas blanco de diferentes cascadas que forman parte de estos procesos a nivel de los residuos de serina/treonina. Sin embargo, en el contexto tumoral su sobreexpresión descontrolada permite el desarrollo del mismo, al promover una disregulación en la supervivencia celular, translocación proteica y progresión del ciclo celular [76].

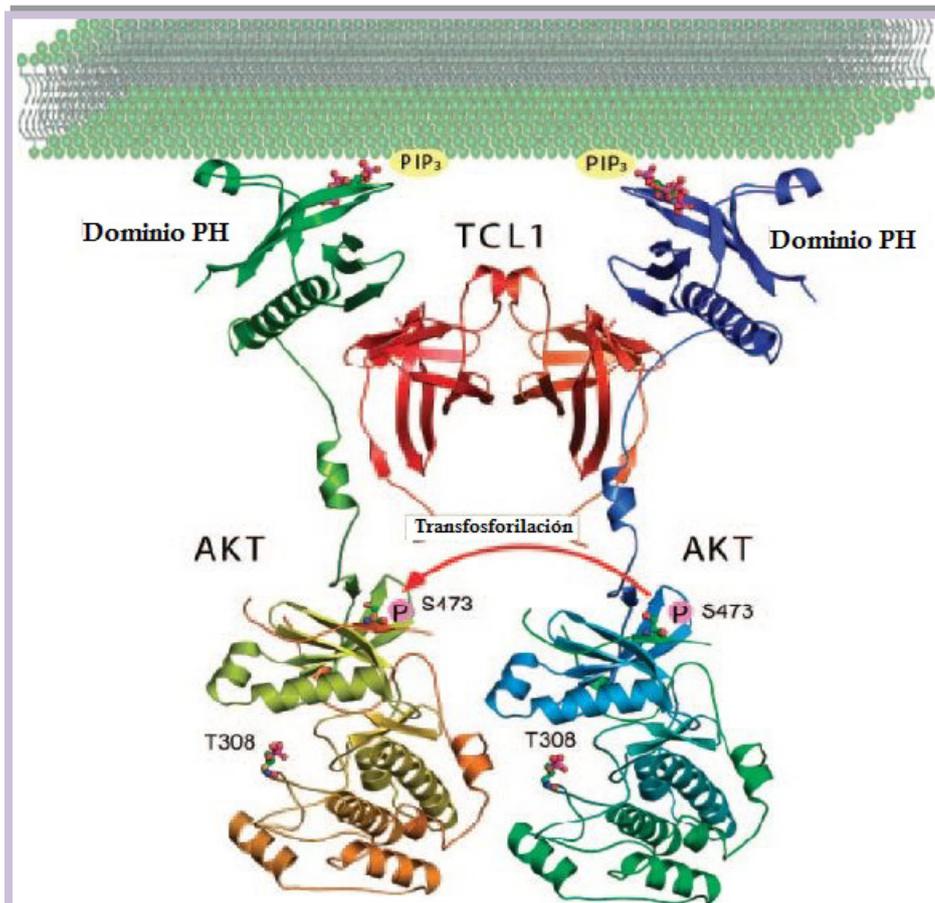


Figura 4- Modelo de la activación de AKT mediante interacción con TCL1. En la figura puede observarse como TCL1 se une a AKT a través de su dominio PH, lo que facilita su oligomerización a nivel de la membrana celular y posibilita así la transfosforilación de sus residuos (Ser-473 y Thr-308). Este paso promueve así la activación de AKT y su subsiguiente participación en las distintas cascadas de supervivencia celular. Figura adaptada de [88].

Pekarsky y col. lograron determinar que TCL1 y AKT interactúan físicamente a través del dominio PH (con homología a la Pleckstrina) de la segunda, y que dicha interacción facilita la oligomerización de AKT lo que se traduce en un aumento de su activación, y posibilita el transporte al núcleo de AKT. A su vez, se encontró que la forma de unión entre ambos ocurre en la forma de dímero de TCL1 (ver **Figura 4**).

En lo que respecta a la LLC se ha observado que la sobreexpresión en linfocitos B leucémicos de TCL1 sería responsable de la inhibición en la metilación de *nov* del ADN [77], lo que como se discutió previamente se asociaría al desarrollo de la forma agresiva de la LLC, y a su vez establecería un nexo que explique la presencia de TCL1 en los casos de LLC con una evolución más agresiva [78].

Si bien hasta el momento se reportan varios blancos de fosforilación de AKT, en la actualidad se desconoce el mecanismo específico que involucra a los mismos en la patogénesis de la LLC de linfocitos B. Sin embargo, algunos estudios realizados con inhibidores de la vía PI3K-AKT-mTOR, que regula el ciclo celular y por ende se encuentra vinculada a la proliferación celular, apoptosis y cáncer, llevados a cabo mediante péptidos que impiden la interacción TCL1-AKT lograron reducir la supervivencia de células tumorales provenientes de pacientes con LLC [79].

MODELO TRANSGÉNICO MURINO E μ -TCL1

En lo que refiere a un modelo que permita el estudio de la LLC en murinos, es posible basarse en el elaborado por Bichi y colaboradores en 2002, [80] el cual parte del hecho de que la expresión desregulada de TCL1 en modelos transgénicos de animales conducen a la manifestación de una leucemia de células T, así como también como se señalara previamente, también abarca a tumores provenientes de linfocitos B.

Este modelo transgénico consiste en la producción de murinos que presenten el gen TCL1 bajo la regulación del promotor del gen V_H y el *enhancer* o potenciador de IgH (E μ) para de esa manera dirigir específicamente la expresión de TCL1 en linfocitos B inmaduros, así como también en maduros. En dichos ratones es posible observar la expansión del bazo, con una zona marginal superpoblada y al cabo de seis meses la expansión de una población de células B con el inmunofenotipo B220^{bajo}/IgM⁺/CD5⁺/CD11b⁺ en el 100% de los ratones y en ausencia de señal alguna de enfermedad, lo que indica la expansión de una población de linfocitos B1-CD5⁺, a nivel de sangre periférica en dónde estos son poco frecuentes. El análisis por citometría de flujo permitió observar que dicha subpoblación presenta una marcada expansión en la cavidad peritoneal a los 2 meses (44%), que pudo evidenciarse en el bazo a los 4 meses (9%) y en la médula ósea a los 8 meses (43%), edad en la cual los ratones presentan un bazo ligeramente agrandado y un nivel celular alto en la cavidad peritoneal de 50 a 100 veces mayor con respecto al control. La histopatología del bazo agrandado revela a su vez un incremento consistente, en el tamaño de la zona marginal. En el entorno de los 13-18 meses de edad todos los ratones se vuelven visiblemente enfermos, presentando esplenomegalia y una marcada leucemia (1,8x10⁸ células/ml contra 2,8x10⁶ células/ml en ratones normales) [80].

A su vez, otro hecho que fortalece este modelo para el estudio de la LLC es que se reportan estudios en que los receptores de las células B (BCR) se asemejan a los que se observan para los pacientes con una LLC agresiva puesto que al igual que en los humanos, la leucemia de ratones TCL1 presenta los genes IgV_H no mutados. [81]

En el mismo sentido otra similitud del modelo de estudio con la LLC es la aparición de cánceres secundarios. Las neoplasias malignas secundarias son complicaciones frecuentes en los pacientes con LLC y en la mayoría de los casos resultan ser la causa más común de muerte en los pacientes [82]. No existe un único componente que permita explicar el aumento del riesgo de neoplasias no hematológicas secundarias en pacientes con LLC, sino que es el resultado de un conjunto de factores entorno al paciente, incluyendo la predisposición genética, la deficiencia inmunológica, la exposición a carcinógenos, así como también los efectos secundarios de los tratamientos

terapéuticos [83]. En el modelo murino de LLC en cuestión, el 25% de los cánceres secundarios observados correspondieron a pilomatrixoma maligno, un tipo de cáncer de piel extremadamente raro en ratones. Hasta el momento, el modelo de E μ -TCL1 parece ser el único reportado que muestra la aparición de tumores malignos secundarios en ratones LLC [84].

Es importante señalar, que a su vez este modelo ha sido empleado en investigaciones para el desarrollo de drogas preclínicas en LLC. A propósito, se ha demostrado que blancos terapéuticos relevantes como BCL-2, MAL-1 , AKT , PDK1, DNMT y p53 se expresan en los linfocitos de este ratón transgénico [85]; lo que ha conducido a profundizar en estudios de sensibilidad a los distintos agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento de la LLC, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Tal es el caso de estudios realizados *in vivo* con ratones E μ -TCL1 que muestran una reducción de células leucémicas, en el tamaño del bazo e inclusive una sobrevida más prolongada en respuesta al tratamiento con Fludarabina [85].

Por otra parte, en otro trabajo realizado por Zanesi y col. con el objetivo de comprobar la eficacia de la Rapamicina, un inhibidor farmacológico de la vía TCL1/AKT/mTOR, se observó que al trasplantar células del ratón E μ -TCL1 en un ratón sinérgico e inducir en éste último LLC, ante un tratamiento con Rapamicina se prolongó significativamente la vida de todos los animales tratados respecto a los no tratados. Aunque, el efecto de la Rapamicina sobre los ratones con LLC fue relativamente corto y al cabo de unas 11 semanas la mayoría de los ratones no sobrevivieron [84].

En función de lo anteriormente mencionado, el modelo transgénico murino E μ -TCL1 resulta ser en la actualidad el que mejor logra emular una LLC humana progresora, permitiendo así la evaluación de diferentes terapias, como también el aproximamiento indirecto a la etiología de la enfermedad y de los mecanismos patogénicos que favorecen su aparición, así como también su progresión.

Dadas estas características es que surge el gran interés por evaluar el comportamiento de la expresión de LPL en este modelo para luego poder compararlo con la expresión de pacientes con IgV_H-NM en la LLC.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar la puesta a punto de las técnicas necesarias para evaluar la expresión del ARN mensajero del gen LPL en pacientes con LLC y en ratones leucémicos, a su vez, comparar dicha evaluación con la expresión a nivel de proteína en las células de pacientes, con vistas a una futura aplicación para un método pronóstico en la LLC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Realizar la puesta a punto del método para evaluar el ARN mensajero del gen LPL por PCR a tiempo real (qPCR).

Para ello se seleccionarán los *primers* específicos que amplifiquen la molécula en cuestión y a partir del ARN extraído de sangre de pacientes con LLC se realizará la transcripción reversa (a ADNc) y posterior puesta a punto de las condiciones para obtener una buena amplificación. Se estudiará un número significativo de pacientes para identificar estadísticamente el punto de corte óptimo que permita identificar progresores de no progresores, comparando para ello los resultados con el estado mutacional del gen IgV_H de cada paciente y con lo descrito en la bibliografía hasta el momento.

2) Analizar la expresión LPL a nivel de proteína por Citometría de Flujo y comparar esta expresión con los datos obtenidos en el objetivo 1.

Teniendo en cuenta resultados previos del laboratorio (iLLC), focalizados en la puesta a punto del marcado de la proteína LPL por citometría de flujo para evaluar su expresión en células de LLC, se realizará el marcado intracitoplásmico de la proteína LPL.

3) Analizar la expresión de LPL a nivel de ARN mensajero en el modelo transgénico Eμ-TCL1.

Se procederá análogamente al objetivo específico 1, extrayendo el ARN mensajero de sangre periférica de ratones transgénicos para posteriormente por transcripción reversa, obtener el ADNc y determinar el nivel de expresión de LPL mediante la utilización de técnicas de PCR a tiempo real y final.



METODOLOGÍA

SOLUCIONES Y REACTIVOS

Buffer Fosfato Salino (PBS)

Solución preparada con NaCl 0,138M, KCl 0,027M, Na₂HPO₄ 0,078M y KHPO₄ 0,015M; pH=7,4.

Medio de cultivo

Se utilizó medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 de Gibco® (*Life Technologies*)

Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para los análisis por citometría de flujo fueron dos: un anticuerpo primario (5D2) un IgG de ratón anti-LPL, el cual fue generosamente proporcionado por John Bruznell y anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado Alexa Fluor 488® (*Life Technologies*).

PACIENTES

Se analizó un total de 35 pacientes con Leucemia Linfóide Crónica por qPCR; dichas muestras fueron obtenidas a partir del banco de células de pacientes del Laboratorio de Investigación en LLC (iLLC). El perfil mutacional de los genes IgV_H dividió el total de los pacientes en dos grupos, donde 19 presentaban IgV_H-MUT y 16 IgV_H-NM.

RATONES

La sangre periférica de los ratones transgénicos utilizados en este trabajo fue proporcionada gentilmente por el Dr. Pablo Morande del iLLC, del Institut Pasteur de Montevideo

EXTRACCIÓN DE ARN, DETERMINACIÓN DE SU CONCENTRACIÓN Y PUREZA

La extracción de ARN se realizó a partir de las CMSP (Células Mononucleares de Sangre Periférica) obtenidas previamente en el laboratorio mediante la utilización de *Ficoll-Hypaque*TM sobre sangre periférica de pacientes con LLC o de ratones transgénicos E μ -TCL1.

Para la extracción se empleó sobre dichas células el reactivo Trizol[®] que permite separar de forma simultánea el ARN, ADN y proteínas a partir de una muestra de tejido homogeneizado. Este producto consiste en una mezcla de tiocianato de guanidino y fenol en solución que luego del agregado de cloroformo y posterior centrifugación permite que la mezcla se separe en tres fases: una fase acuosa que contiene el ARN, una interfase que contiene el ADN y una fase orgánica que contiene las proteínas. Por lo tanto, a partir de la separación de las fases es posible aislar cada uno de los componentes, teniendo en cuenta que para ello es suficiente emplear un mililitro de reactivo para 5-10x10⁶ células. Es importante mencionar que es posible aislar todo tipo de ARN desde 0.1-15kb de largo, y que el mismo se obtiene con escasa contaminación, siendo posible su posterior uso para aislar ARNm, así como también Northern blot o Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El procedimiento para la extracción de ARN que a continuación se describe se basa en el reportado por Chomczynski en 1993 [86]. El primer paso para la separación de fases como se mencionó es el agregado de 0,2ml de Cloroformo por cada mililitro de reactivo empleado, luego la muestra es centrifugada a 12.000g por 15 minutos a 2-8°C. Esta centrifugación permite la separación en las tres fases ya explicadas donde el ARN se encuentra en la superior (fase acuosa). Para aislar el ARN se transfiere la fase mencionada a otro tubo y se le agrega 0,5ml de 2-propanol por cada ml de reactivo y se centrifuga nuevamente a 12.000g por 10 minutos a 2-8°C para de esa manera lograr que el ARN precipite en el fondo del tubo. Una vez hecho esto, se remueve el sobrenadante y se lava con 1ml de Etanol 75% por ml de Trizol[®] empleado y se centrifuga a 7.500g por 5 minutos 2-8°C. Luego en el último paso, se descarta el sobrenadante, se deja secar el precipitado brevemente y se resuspende en H₂O libre de ARNasas.

Para la determinación de la concentración y pureza del ARN obtenido, se realizan mediciones de absorbancia a 260nm y 280nm en un espectrofotómetro. Determinando la absorbancia a 260nm es posible obtener la concentración del ARN sabiendo que 1 UA (Unidad de Absorbancia) se corresponde a 40 μ g/mL de ARN. Por otro lado, el cociente de absorbancias A₂₆₀/A₂₈₀, es un parámetro de pureza del ácido nucleico aislado, teniendo en cuenta que 2 es el valor óptimo y sabiendo que 280nm es la longitud de onda en donde absorben los residuos aromáticos de las proteínas.

SÍNTESIS DE ADNc POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Una vez aislado y cuantificado el ARN, el paso siguiente fue obtener el ADN copia a partir del ARNm para poder realizar posteriormente la amplificación por PCR y qPCR. Para ello se recurrió a una transcriptasa reversa o retro-transcriptasa que es capaz de obtener ADN doble hebra a partir de ARN simple hebra.

La enzima utilizada fue la *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) de *Invitrogen* y a su vez se recurrió a un primer de oligo (dT) capaz de hibridar con la modificación postranscripcional de los ARNm, la cola poliA.

Los pasos para llevar a cabo la reacción se ciñeron al siguiente protocolo:

En primer lugar se prepararon soluciones que contuvieran una mezcla de dNTPs (10mM), oligo (dT) (500µg/mL) y H₂O (para este y los restantes pasos se respetaron los volúmenes óptimos indicados por el fabricante de la enzima), luego se agregaron cantidades de ARN siempre equivalentes de aproximadamente 500ng para cada muestra y se incubó durante 5 minutos a 65°C y se colocó en hielo.

Una vez hecho esto, se agregó otra solución compuesta por el buffer de la enzima M-MLV (5X) y DTT. Se incubó durante 2 min a 37°C y se agregó la enzima M-MLV (200u/µL) y se dejó reaccionar primero a 37°C durante 50 minutos y luego a 70°C durante 15 minutos. Una vez producidos los ADNc los mismos fueron conservados a -20°C.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR es una técnica poco costosa, simple y rápida que permite amplificar exponencial y específicamente un fragmento corto de ADN (entre 100-600pb) contenido dentro de un molécula mucho mayor de ADN. La PCR supone el uso de un par de cebadores, cada uno de aproximadamente 20 nucleótidos de largo que son complementarios a los extremos de la secuencia definida en cada una de las dos hebras de ADN, así como también de desoxinucleótidos. Estos *primers* se hibridan a cada hebra luego de desnaturalizar la molécula de ADN por temperatura y son extendidos por una ADN polimerasa que agrega nucleótidos en sentido 5'→3' sobre la hebra monocatenaria, por lo tanto realiza una copia de la secuencia en cuestión. Una vez hecha esta copia, los cebadores pueden volverse a utilizar no solo para realizar una copia del segmento original sino que también puede utilizarse sobre el fragmento copiado en la ronda anterior de síntesis; y así sucesivamente conduce a una amplificación exponencial (como se muestra en la Figura 5).

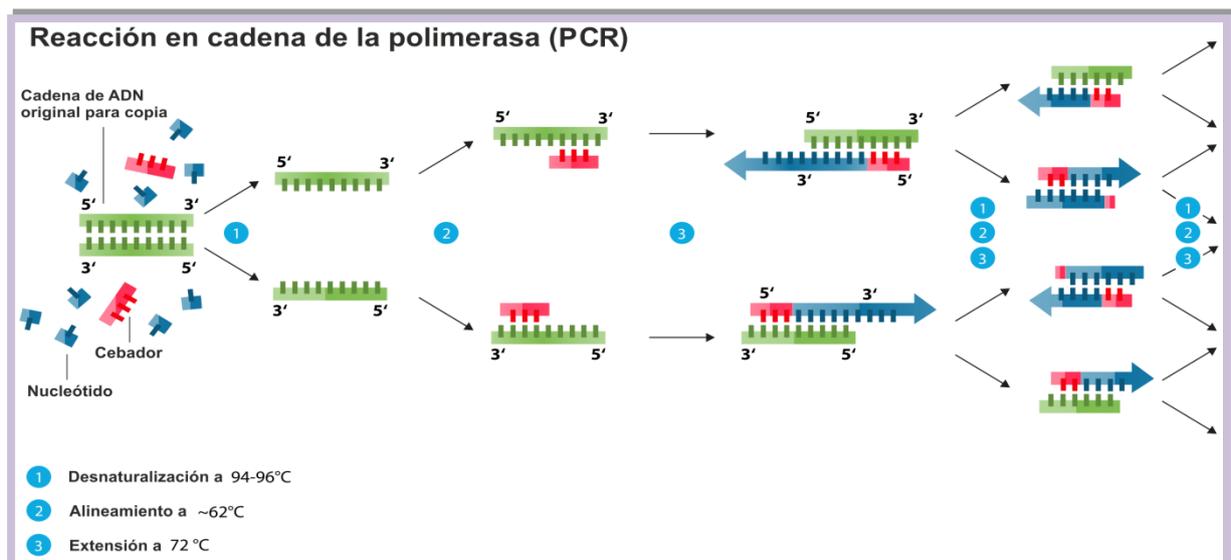


Figura 5- Esquema de la reacción de PCR. En la figura se representan las tres etapas principales de una PCR: desnaturalización de la doble hebra de ADN, alineamiento o “annealing” de los cebadores a cada hebra de ADN por complementariedad de bases y por último la extensión de los cebadores por la Taq polimerasa en el sentido 5'→3'. Este ciclo se repite aproximadamente 30 veces. La temperatura de alineamiento señalada varía dependiendo del ensayo.

Sin embargo, como es necesario elevar la temperatura para separar a las dos hebras de ADN en cada ronda de este proceso, el mayor avance en esta técnica ocurrió con el descubrimiento de una ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) obtenida a partir de *Thermus aquaticus*, una bacteria termófila que crece en aguas calientes, y como resultado de ello no es necesario agregar nueva enzima en cada ronda de amplificación.

Para los casos en el que el interés sea obtener una noción de cantidad expresión del ADNc de partida, es necesario realizar otra reacción en paralelo, en donde se utilicen otros cebadores que amplifiquen un gen de expresión constitutiva como el gen β de -actina, HSP90 o GAPDH (Gliceraldeído 3-Fosfato Deshidrogenasa) para cada una de las muestras.

Para este caso el gen constitutivo utilizado fue el de GAPDH y en la **Tabla 2** se muestran los cebadores utilizados para las reacciones de PCR a tiempo final así como también de PCR a tiempo real. Los mismos fueron diseñados previamente en los estudios realizados por Oppezco y col. [40], teniendo en cuenta para ello la optimización de las distintas variables: T_m , ausencia de auto-complementariedad (estructuras secundarias) y complementariedad (dímeros de cebadores), tamaño, entre otras.

Tabla 2- Secuencia de los primers para GAPDH y LPL utilizados para las reacciones de PCR a tiempo final y PCR a tiempo real.

	GAPDH	LPL
Forward	5` GGTGCTGAGTATGTCGTGGA 3`	5` GGAATGTATGAGAGTTGGGTGC 3`
Reverse	5` ATGCCAGTGAGCTTCCGTT 3`	5` CAATGCTTCGACCAGGGGACC 3`

En los ensayos realizados por PCR se utilizó la enzima Taq ADN polimerasa con los reactivos necesarios (H_2O , dNTP, Mg^{2+} , buffer de la enzima) y en las condiciones establecidas por su fabricante (Fermentas) mientras que el programa de la reacción establecida en el termociclador 2720 *Thermal Cycler (Applied Biosystems)*, fue determinado en función del fragmento a amplificar y de las propiedades de los primers a utilizar (T_m o Temperatura de fusión, tamaño y porcentaje de GC) y se muestra esquematizado en el **Figura 6**.

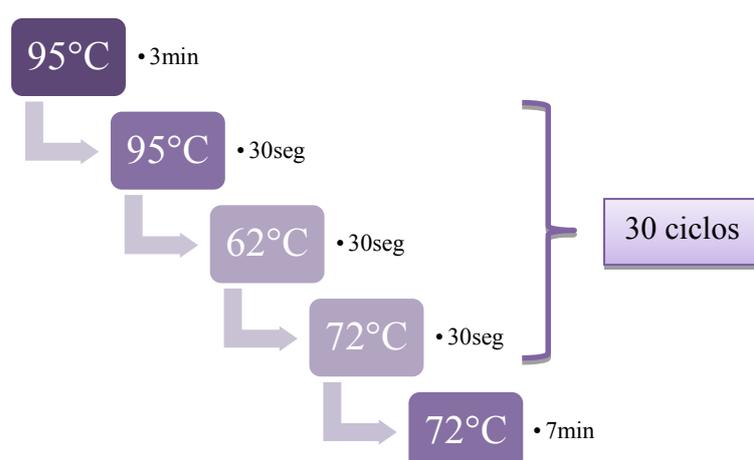


Figura 6- Programa de la reacción de PCR. En corchetes se representan las tres etapas de amplificación que son repetidas 30 veces en el termociclador. Se observa un paso previo de inicialización requerido para las Taq que requieren activación por calor y un paso de elongación final de para asegurar que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente extendido.

Luego de culminada la PCR, el paso siguiente a realizar es la evaluación del producto obtenido mediante una electroforesis en gel de agarosa, la cual permite separar las moléculas de ADN en función de su tamaño al migrar por una matriz porosa inerte como la agarosa en presencia de un campo eléctrico, donde las moléculas de mayor tamaño quedarán más retenidas migrando por lo tanto más lentamente, mientras que las más pequeñas se desplazarán más rápidamente hacia el polo positivo (por estar cargadas negativamente).

Una vez finalizada la misma, debido a su abundancia el revelado de las bandas es posible realizarlo mediante la exposición a radiación UV en presencia de Bromuro de Etidio, un agente intercalante del ADN el cual aumenta su fluorescencia en 20 veces al intercalarse entre las bases del ADN. En particular, en los ensayos realizados se practicó una electroforesis horizontal en agarosa, con una concentración del 2% (en función del tamaño del fragmento amplificado de 410pb aproximadamente para LPL) y una cantidad de BrEt de 0,5µg/ml para la visualización.

Posteriormente las imágenes de las bandas obtenidas a partir de los geles se analizaron por densitometría (utilizando el programa de software libre, ImageJ), donde los valores para las distintas muestras fueron normalizados con respecto a lo observado para GAPDH por tratarse de un gen que se expresa de manera constante en las células.

PCR A TIEMPO REAL (qPCR)

La técnica de PCR a tiempo real surgió por la necesidad de obtener medidas cuantitativas de forma rápida, sensible y específica de la cantidad ARNm en una célula en un momento dado. Como se mencionara, para la PCR a tiempo final se utiliza como colorante fluorescente el BrEt, sin embargo, la detección por este método no es muy sensible y cuando la banda es detectable es porque generalmente la fase exponencial de la reacción ha finalizado. Esto es porque las características de la reacción de PCR hacen que la cantidad de copias del fragmento de ADN amplificado aumente en cada ciclo siguiendo una ecuación exponencial del tipo 2^N , donde N es el número de ciclos. Pero este aumento ocurre en forma exponencial hasta alcanzar una fase de meseta o saturación, de forma que si se observase un gráfico en escala lineal del proceso la cantidad registrada en los últimos ciclos no permitiría determinar por cuestiones de diferencias de escala la amplificación en los primeros ciclos, sin embargo, si por el contrario se realizara un gráfico en escala logarítmica sería posible observar las diferencias en la cantidad de ADN en cada ciclo pudiendo apreciar a su vez que una parte de dicho gráfico se aproxima a una recta. (**Figura 7**)

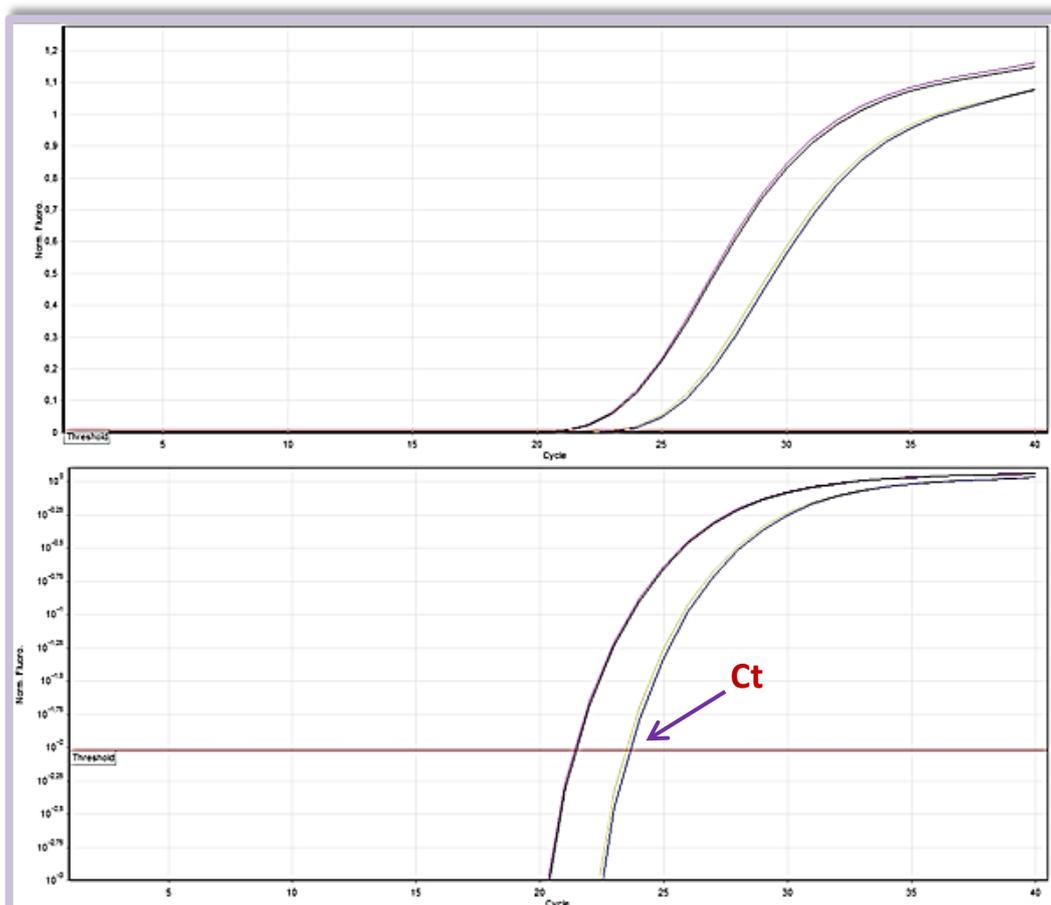


Figura 7- Gráficas típicas de qPCR. En la gráfica superior se observa la representación lineal del aumento de la cantidad de ADN para cada ciclo, debajo puede observarse el mismo gráfico pero en escala logarítmica donde se puede apreciar la región que se aproxima a una recta. Observar como la línea roja en el gráfico superior se encuentra situada en el medio del gráfico inferior.

Y el fundamento de la PCR a tiempo real se basa en el hecho mencionado, es decir, en el de utilizar un termociclador que irradie las muestras con haces de luz a determinadas longitudes de onda de excitación y logre detectar la emisión de fluorescencia de un compuesto que sea capaz de aumentar de forma sensible su emisión en función de la cantidad de ADN de doble hebra presente en cada momento del proceso de la reacción y así de esta manera poder estudiar la etapa más representativa de la reacción, la fase lineal (representada en el gráfico inferior de la **Figura 7**).

La razón de analizar la fase lineal es porque a mayor número de ciclos, por ejemplo entre los 30-35 ciclos tal como puede observarse en la **Figura 8**, la cantidad de ADN para muestras que partieron de distinta concentración de molde, es muy semejante debido a la saturación de la reacción, y esta es la razón por la que si se pretende obtener una medida semi-cuantitativa por la técnica de PCR a tiempo final debe realizarse con mucha precaución y tener en cuenta que únicamente se está observando la parte final del proceso, la que es detectable con Bromuro de Etidio en un gel de agarosa.

En efecto, es por ello que el parámetro que se utiliza para calcular niveles de expresión génica por qPCR es el que se obtiene a partir del número de ciclo en el que el gráfico es interceptado por un umbral o *Threshold* en la parte lineal utilizando la escala logarítmica, y que se conoce como *Ct* ($Cycle_{Threshold}$) el cual se encuentra representado en la parte inferior de la **Figura 7**.

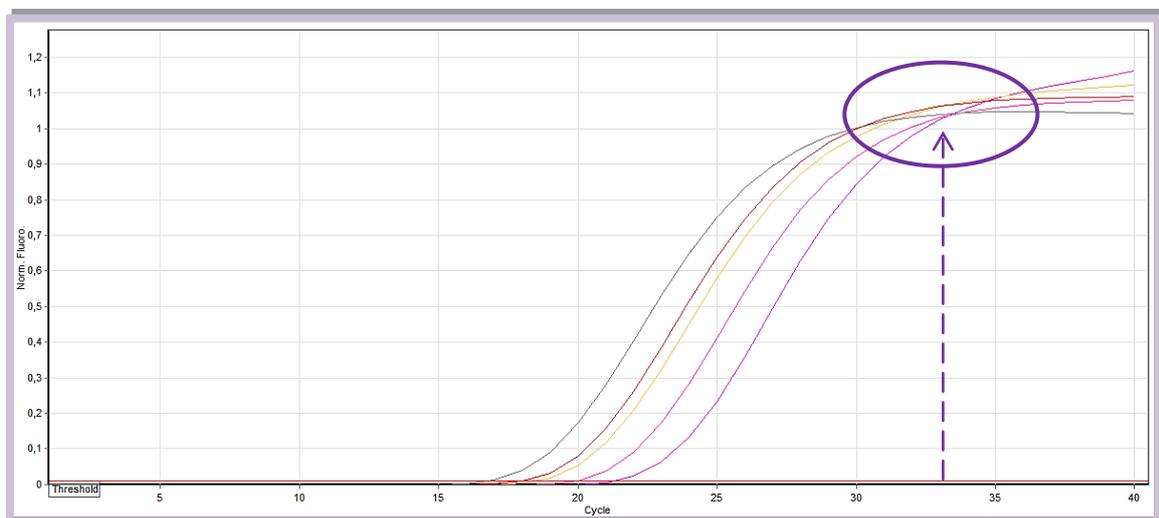


Figura 8- Gráficas de qPCR en escala lineal. En la gráfica puede observarse como a un número mayor de ciclos (30-35) no es posible observar diferencias en el total de ADN de muestras que claramente contienen distinta cantidad de molde de partida como se observa en los ciclos anteriores.

El fluoróforo más empleado y que también será utilizado en este caso para los ensayos de qPCR es el SYBR[®] Green I, el mismo presenta un λ máximo de excitación en el azul a 488nm y

uno de emisión en el verde a 522nm [87]. Sin embargo, el hecho de que el SYBR[®] Green I sea capaz de emitir fluorescencia al unirse a la doble hebra de ADN sin especificidad de secuencia, supone también que puedan observarse señales interferentes proveniente de productos no específicos, siendo los más comunes los dímeros de *primers*, pero también existiendo otros como los producidos por la unión inespecífica de cebadores o por contaminación.

Es por ello que el equipo de qPCR realiza un análisis adicional que permite determinar la especificidad del producto obtenido y es el análisis de la Temperatura de fusión o Curva de *Melting*, que se obtiene a partir de modificar gradualmente la temperatura y en simultáneo registrar la fluorescencia de la muestra, luego el equipo realiza un gráfico de la derivada de la fluorescencia en función de la temperatura contra la temperatura, lo que producirá un pico característico situado en la T_m , que como se dijera depende del tamaño y composición del fragmento amplificado, por lo tanto es esperable que todas las muestras luego de realizada la PCR presenten el mismo pico para el gen amplificado, de lo contrario eso indica la presencia de productos no deseados como se ve representado en la **Figura 9**.

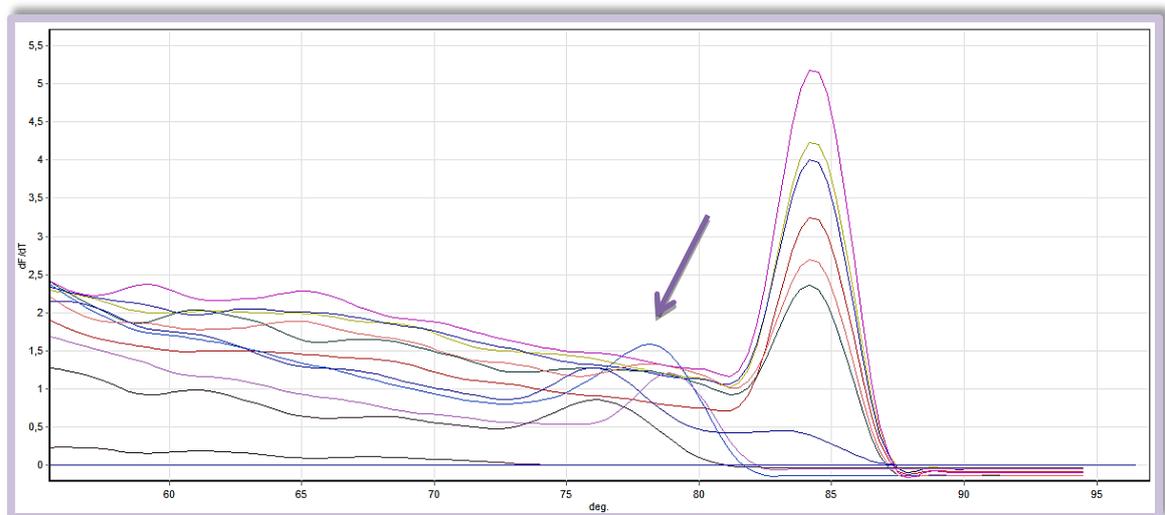


Figura 9- Curvas de *melting* representativas de LPL. En la gráfica se observa como las muestras en donde se amplificó LPL muestran un pico característico del fragmento amplificado a aproximadamente 84°C, mientras que con la flecha se indica las muestras en donde se observa una amplificación inespecífica que no se corresponde con las demás muestras.

En lo que refiere a la forma de cuantificar por qPCR existen dos maneras, o realizar una cuantificación en términos absolutos para lo cual es necesario realizar una curva de calibración a partir de diluciones de un estándar de ADN de concentración conocida e interpolar la medición obtenida en dicho gráfico; o en términos relativos, en donde la expresión del gen en estudio (LPL) es normalizada con otro gen que como se mencionó funciona como referencia, un gen constitutivo o *housekeeping* cuya expresión sea estable entre las distintas células, es decir que actúe como estándar interno, siendo utilizado el mismo gen que para los ensayos de PCR a tiempo final, es

decir, GAPDH. Por lo tanto, para el estudio de la expresión génica de LPL se utilizó el parámetro de ΔCt , es decir $Ct (LPL) - Ct (GAPDH)$.

Teniendo en cuenta lo mencionado se realizaron qPCR de los genes de LPL y GAPDH a partir de ADNc proveniente de pacientes con LLC y ratones transgénicos, utilizando para el ello el kit de qPCR *Kapa SYBR[®] FAST* con los reactivos y condiciones especificadas por su proveedor (*Kapa Biosystems*) y volúmenes variables de reacción (de 10 μ l o 20 μ l finales). En la **Figura 10** se detalla el programa de la reacción diseñado para la reacción de qPCR en el software de Eco[™] (Illumina).

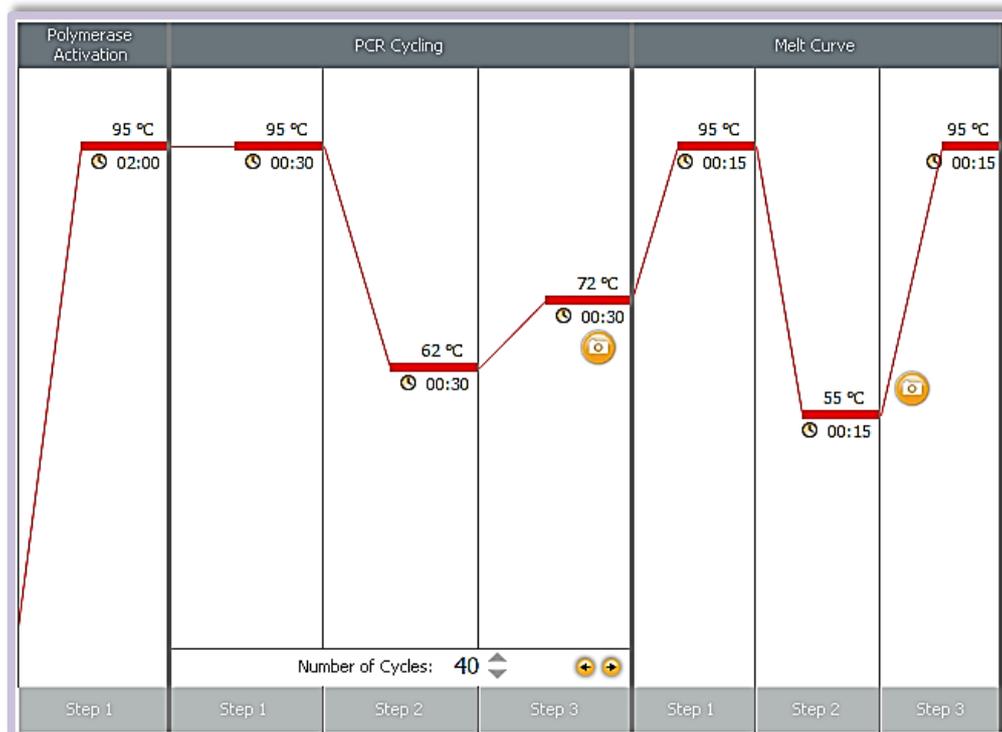


Figura 10- Esquema del programa utilizado para las reacciones de qPCR. En el diseño se incluyen las etapas análogas a las ya vistas para la PCR a tiempo final (*Polymerase Activation* y *PCR cycling*), así como una etapa adicional correspondiente a la curva de fusión (*Melt Curve*). Obtenido con el software de Eco-Illumina.

Los equipos utilizados para obtener las reacciones de qPCR fueron *Corbett-Rotor Gene* (Qiagen) y *Eco[™]* (Illumina). A su vez, los análisis estadísticos del conjunto total de los datos fueron realizados con el programa *GraphPad Prism*, empleando para ello test estadísticos no paramétricos, es decir para datos que no es posible asegurar que tengan distribución gaussiana. Existiendo dos tipos de test para este caso, el denominado Wilcoxon y el Mann Whitney (donde ambos admiten grupos pequeños), siendo el elegido para el procesamiento de datos el último, debido a que para el test de Wilcoxon todos los grupos deben presentar igual número de individuos, lo que no se aplica para los casos estudiados.

CITOMETRÍA DE FLUJO (CF)

La citometría de flujo es una poderosa técnica utilizada para el recuento y análisis multiparamétrico de las características de las células (tamaño, granularidad, y presencia de biomarcadores) así como de organelos celulares.

Esto es posible gracias a que en los citómetros de flujo las células que se encuentran en suspensión, se las somete al pasaje por un filamento extremadamente delgado lo que produce un flujo laminar que hace que las células pasen de a una y en fila a través de un haz de rayo láser a una velocidad promedio de más de dos mil partículas por segundo. El resultado es que ante el pasaje de las células la luz es dispersada en distintas direcciones, lo cual es detectado por un conjunto de tubos fotomultiplicadores ubicados a diferentes orientaciones con respecto al flujo, que permiten obtener distintas informaciones referentes a las células. En efecto, el que se encuentra en línea con el haz del láser es capaz de detectar la dispersión frontal la cual es proporcional al volumen celular, denominado como FSC (*Forward Scatter*, o detector frontal), mientras que el SSC (*Side Scatter* o detector lateral) se ubica a por lo general a 90° con respecto al haz y analiza la dispersión que ocurre hacia los laterales y que es proporcional a la complejidad interna de la célula (granularidad, forma del núcleo y rugosidad de la membrana citoplasmática).

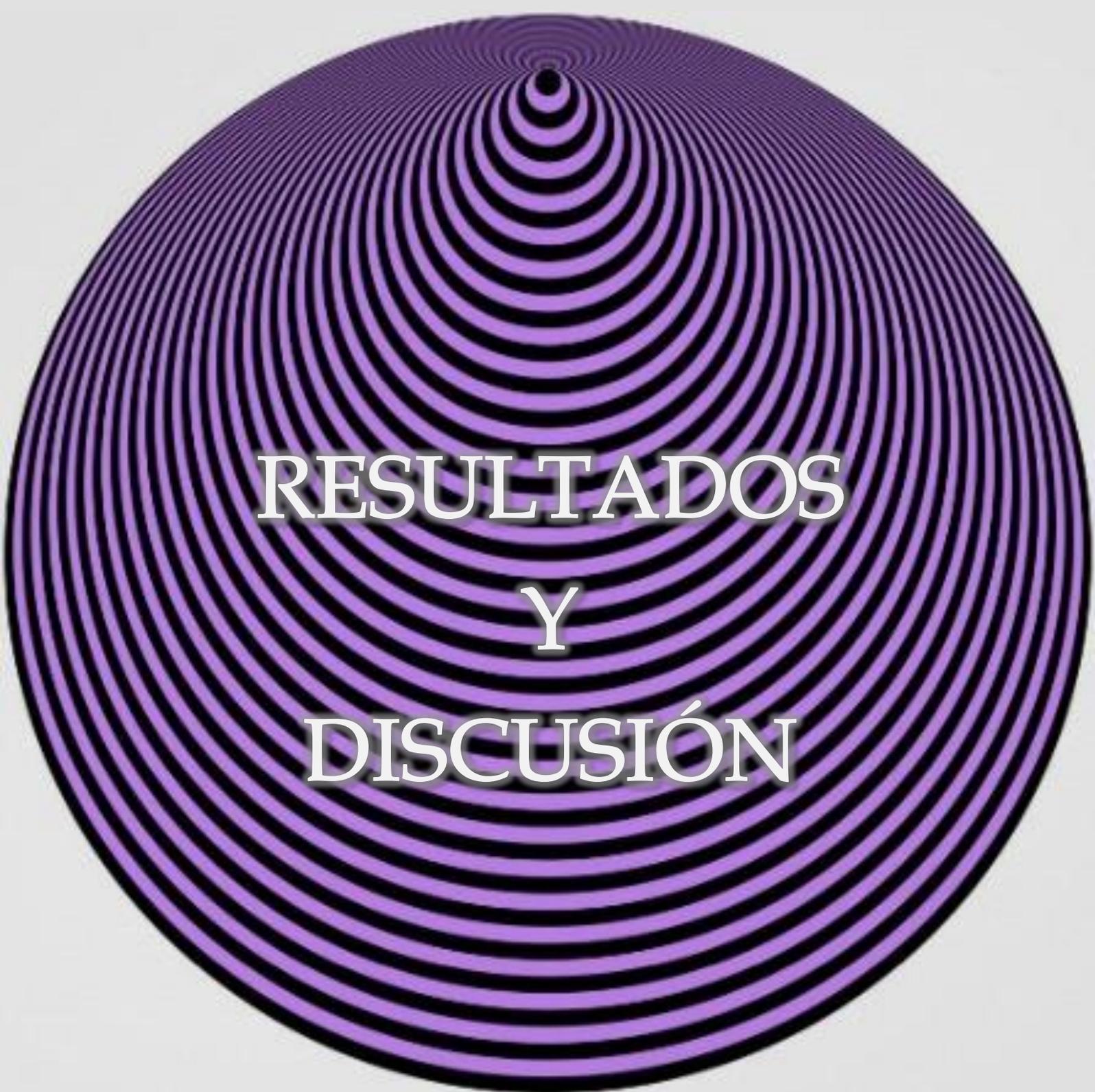
A su vez, los citómetros de flujo contienen un conjunto de detectores que son capaces de medir la fluorescencia a diferentes rangos de longitudes de onda, permitiendo así captar la emisión de fluoróforos unidos a anticuerpos, que se encuentren asociadas a componentes celulares presentes dentro o en la superficie de las mismas. Si bien cada fluoróforo posee un pico de excitación característico, y una longitud de onda de emisión también característica, sus espectros de emisión con frecuencia se superponen, por consiguiente, la combinación de marcadores que pueden emplearse depende de la longitud de onda del o los láseres utilizados para excitar los fluoróforos y de los tipos de detectores que el equipo tenga disponible.

Para la detección de LPL en los linfocitos B leucémicos provenientes de pacientes con LLC, se desarrolló un protocolo teniendo en cuenta que LPL es una proteína soluble y en condiciones fisiológicas se adhiere a las células endoteliales del lumen, lo que resultaría en la presencia de LPL sérica (producida normalmente por células parenquimales y macrófagicas) interaccionando con la membrana del linfocito B. Con el objetivo de cuantificar solo la LPL producida por el linfocito B leucémico se incluyó en el protocolo el lavado con Heparina de las células, ya que se ha demostrado que estos lavados sueltan la LPL unida por interacciones hidrofóbicas a las membranas celulares, debido a la alta afinidad de la LPL por la Heparina [43]. Este paso permitiría evaluar solo

la producción de LPL del linfocito B leucémico intra-citoplásmica y corroborar si la expresión proteica es un buen marcador pronóstico en la célula B de LLC.

El protocolo seguido para el análisis por citometría de flujo fue el siguiente:

Se descongelan las células y se lavan con 10 mL de RPMI (sin suero fetal bovino) precalentado a 37°C, luego se centrifuga a 400g por 5 minutos y se descarta el sobrenadante. Se resuspende suavemente el precipitado con las células y se incuba por 15 minutos a 37°C-5% de CO₂ con 5mL de RPMI precalentado a 37°C, luego se centrifuga a 400g por 5 min. y se descarta el sobrenadante. Luego se incuba las células con 5mL U/mL (dilución 1:100 de solución clínica) de Heparina sódica en RPMI/BSA (3%) precalentado durante 5 min. a 37°C-5% de CO₂. Se centrifuga a 400g por 5 min., se descarta el sobrenadante y se resuspende suavemente el precipitado. Se lava con 10 mL de PBS a temperatura ambiente y se fijan las células con 10% PFA en PBS por lo menos durante 15 minutos. Luego se lava el fijador con PBS, se bloquea y permeabiliza con PBS-T (0.1% Triton X-100 en PBS) por 10 min., a temperatura ambiente. Se incuba durante toda la noche con 1 µg/mL del anticuerpo 5D2 anti-LPL en 3% BSA en PBS-T a 4°C. Se lava con PBS e se incuba durante 45 min. con 2 µg/mL con el anticuerpo Alexa Fluor® 488 anti-IgG de ratón en 3% BSA en PBS-T. Por último se lava con PBS y se vuelve a fijar con 0,5% PFA antes del análisis por citometría, el cual fue realizado con el citómetro de flujo *Cyan Analyser™* (Dako Cytomation)



RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LPL POR qPCR EN PACIENTES CON LLC

Luego de realizar la extracción de ARN a partir de las CMSP aisladas de pacientes con LLC, y sintetizar su correspondiente ADNc de acuerdo a como se describió (ver metodología), se procedió a cuantificar la expresión génica del marcador pronóstico de LPL en forma relativa al gen constitutivo GAPDH. Para este propósito, se llevaron a cabo reacciones de PCR a tiempo real utilizando los cebadores para GAPDH y LPL indicados en la **Tabla 2** y siguiendo el programa de la reacción representado en la **Figura 10**.

En primera instancia, fue posible determinar que el resultado de la reacción de qPCR resultó ser específico tal como se esperaba, lo que fue posible de determinar gracias a las curvas de *Melting* incluidas dentro del programa de reacción una vez finalizada la amplificación. En la **Figura 11** se muestra el resultado de dichas curvas para un experimento representativo, tal como puede observarse, se evidencian dos picos bien definidos, correspondientes a los T_m de los fragmentos amplificados para los dos genes estudiados.

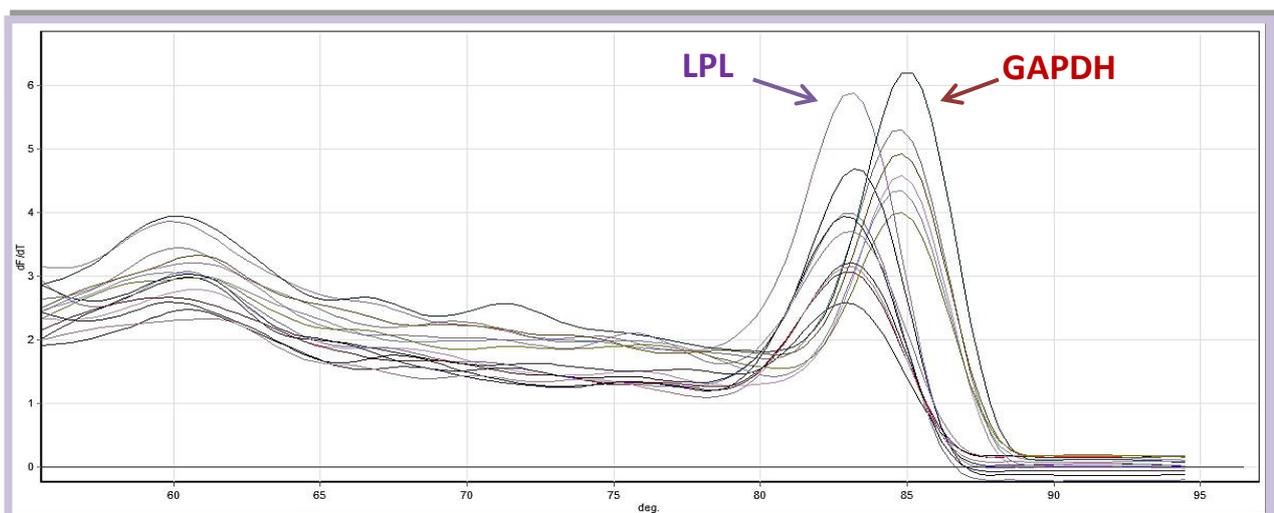


Figura 11- Curvas de *melting* obtenidas luego de la reacción de qPCR de pacientes con LLC. Las curvas mostradas corresponden a un experimento representativo, en donde los dos picos observados corresponden a la amplificación específica de los genes estudiados, LPL y GAPDH. Los picos menores observados en el entorno de los 60°C corresponden a dímeros de primers y estructuras inespecíficas afines.

El análisis a partir de las gráficas de qPCR correspondientes a los pacientes se basó en la determinación del Ct para las distintas curvas de amplificación, utilizando para establecer dicho parámetro el punto de corte con una recta umbral o *Threshold* situada sobre el gráfico a escala logarítmica en su correspondiente parte lineal (ver metodología de qPCR).

Una vez definido el Ct del gen de LPL se normalizó con respecto al Ct del gen GAPDH, obteniendo así el parámetro ΔCt , que cuantifica el nivel de expresión de LPL en las distintas muestras. Para obtener una mejor visualización de las diferencias observadas en los resultados obtenidos, se utilizó para el estudio la fórmula matemática $2^{-\Delta Ct}$, muy recurrente en la literatura para el análisis por qPCR, logrando de esta manera diferenciar más claramente a los pacientes que presentan una mayor expresión del ARNm de esta proteína de los que no.

Por otro lado, para la correcta evaluación del valor pronóstico de LPL se separó la población de datos en dos grupos en función del perfil mutacional de los genes IgV_H de cada paciente (dato ya existente), con el propósito de ratificar o no la sobreexpresión de la proteína en los casos de pacientes NM con una LLC más agresiva y una nula o baja expresión de LPL en los pacientes MUT con un mejor pronóstico, el resultado obtenido se muestra en la **Figura 12**.

A su vez, sobre el total de 35 pacientes analizados (separados en 19MUT y 16NM) se determinó tal como puede observarse en la misma figura el punto de corte (*cut-off*) óptimo que permite diferenciar a los pacientes progresores con $IgV_H\text{-NM/LPL}^+$ de los no progresores $IgV_H\text{-MUT/LPL}^-$ situado en $y=2$. El mismo se estableció a partir de la media obtenida para los pacientes $IgV_H\text{-MUT/LPL}^-$ más dos desvíos estándar. El número de datos que quedan separados del grupo por el *cut-off*, son de tan solo 1 y 3 valores para los pacientes $IgV_H\text{-MUT}$ y $IgV_H\text{-NM}$, respectivamente.

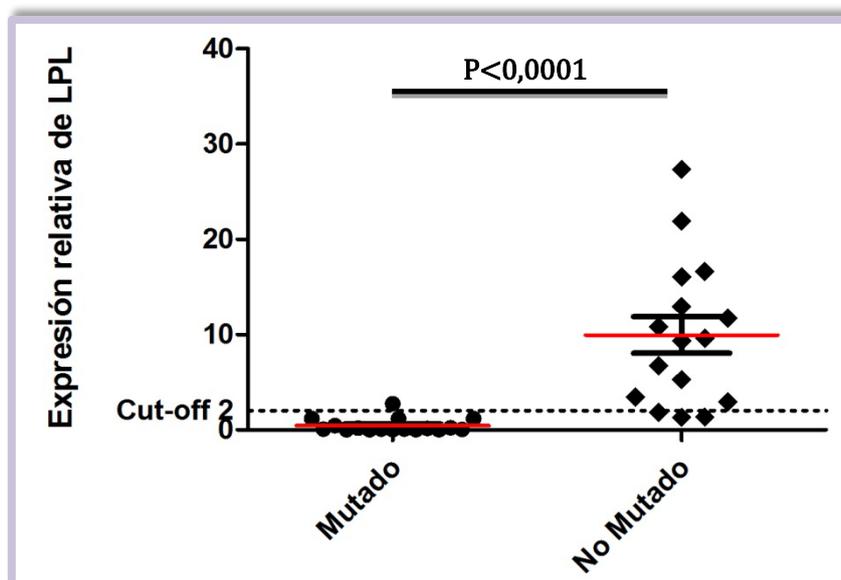


Figura 12- Niveles de expresión de LPL en pacientes con LLC clasificados en función del perfil mutacional de IgV_H . El gráfico es el resultado de la cuantificación relativa de LPL por qPCR de un total de 35 pacientes (19MUT y 16NM). La línea punteada (en $y=2$) representa el punto de corte óptimo que permite diferenciar los pacientes que presentan una sobreexpresión de LPL, de los que no, determinado a partir de la media para MUT más dos desvíos estándar. Los grupos muestran ser diferentes con un valor de $P < 0.0001$ al aplicar el test de Mann-Whitney.

Asimismo, para evaluar las diferencias entre los dos grupos, se realizó el test no paramétrico para muestras desapareadas de *Mann-Whitney*, obteniéndose un p-valor de $P < 0,0001$.

Si bien el número de pacientes analizados es bajo en comparación con los estudios en los que se reporta la evaluación del valor pronóstico de la expresión de LPL a nivel de ARNm [51], [52], [54], [55], [41], este resultado se sitúa en el mismo sentido que dichos trabajos.

La asociación de los valores de qPCR con el perfil mutacional de los genes IgV_H y el resultado obtenido por el análisis estadístico de los datos, permiten afirmar que la cuantificación del ARNm de LPL muestra ser una vez más un marcador pronóstico robusto para la LLC. Donde a pesar de que la cohorte de individuos estudiados es relativamente pequeña, se define una clara tendencia en donde los pacientes que presentan una sobreexpresión de LPL se relacionan con una progresión desfavorable de la enfermedad, mientras que los pacientes con niveles insignificantes o muy bajos de expresión muestran un desarrollo indolente de la LLC.

En efecto, esta fuerte asociación permite definir un punto de corte que logra diferenciar de forma eficiente (para las condiciones del estudio en cuestión) a los dos grupos de pacientes mencionados, tal como se visualiza en la **Figura 12**.

COMPARACIÓN DE DETECCIÓN DE LPL POR qPCR Y CITOMETRÍA DE FLUJO

En paralelo a la puesta a punto de la técnica de qPCR en el laboratorio para la detección de LPL a nivel de ARN, resultó interesante determinar si lo observado por esta metodología podía ser igualmente reproducible al realizar un análisis de la expresión de esta proteína por citometría de flujo. Para ello se tomaron algunos pacientes representativos de los analizados por qPCR y siguiendo el protocolo descrito (ver metodología, CF) se realizó la detección de LPL por CF; el resultado de dicha comparación se observa en la **Figura 13**.

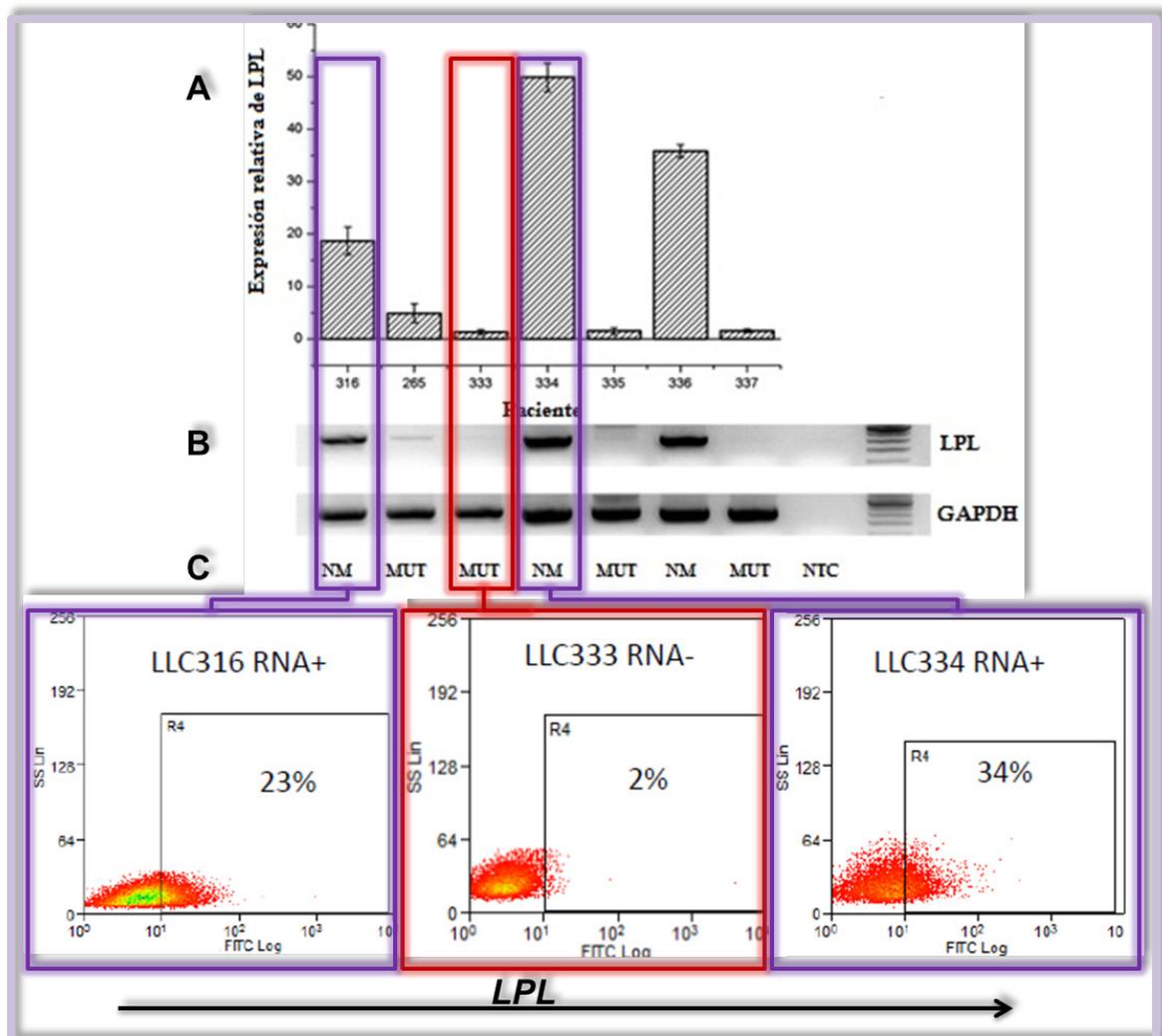


Figura 13- Análisis de expresión de LPL por PCR, qPCR y CF. A-Evaluación por qPCR de la expresión relativa de LPL a nivel de ARN en 7 pacientes con LLC. B-Ensayo de PCR a tiempo final con los mismos pacientes, donde se puede apreciar la correlación con los resultados mostrados en el panel A, y la asociación con el perfil mutacional de los genes IgV_H. C- Detección por CF mediante anticuerpos específicos para LPL sobre tres pacientes representativos en dónde se observa la concordancia de la expresión proteica con la cuantificación por qPCR (porcentajes de células en la región R4). Para el estudio por CF se procedió previamente a lavar con Heparina para eliminar la señal proveniente de la LPL sérica unida a la membrana de los linfocitos B leucémicos.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LPL EN EL MODELO MURINO E μ -TCL1

Como el modelo transgénico murino E μ -TCL1 ha mostrado ser el que mejor logra emular las características de una LLC humana y con mal pronóstico, resulta muy interesante realizar la determinación de si los linfocitos B provenientes de la sangre periférica de dichos ratones presentan o no sobreexpresión de LPL. Por este motivo, se procedió a realizar la evaluación de la expresión de LPL por PCR a tiempo final, de forma análoga a los pacientes con LLC. Es decir, obteniendo ADNc a partir del ARN aislado previamente, para luego amplificar por PCR mediante cebadores específicos los genes de LPL y GAPDH. Para dicho estudio se analizó un total de 18 ratones, de los cuales 10 correspondieron a E μ -TCL1, y 8 ratones “*littermate*” o compañeros de camada. Éstos últimos son ratones que por producto de los mecanismos de herencia, al momento de los cruzamientos realizados, resultan con un fenotipo normal (homocigota negativo), esto es sin sobreexpresión de TCL1. Por lo tanto el grupo de dichos murinos constituye el control interno en dónde, si la hipótesis del presente trabajo es correcta, se espera no detectar la expresión de LPL en contraposición a sus pares transgénicos. El resumen del estudio de la expresión de LPL por PCR a tiempo final se encuentra representado en la **Figura 15**.

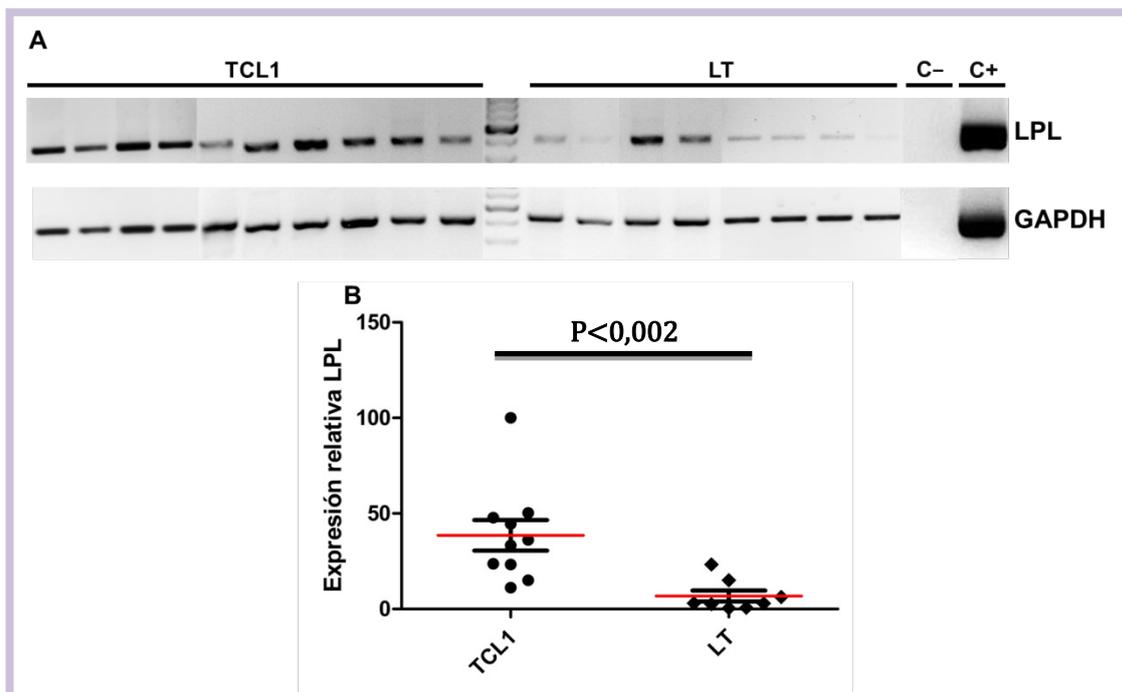


Figura 15- Análisis de expresión de LPL en ratones transgénicos E μ -TCL1 (TCL1), y *littermate* (LT) por PCR. Panel A: Se observan las bandas obtenidas para LPL y GAPDH en gel de agarosa luego de la amplificación por PCR en 10 ratones TCL1 y 8 LT, se muestran a su vez los carriles correspondientes al control negativo sin ADN (C-) y al control positivo, un paciente con LLC IgV_H-NM (C+). **Panel B:** Análisis por densitometría de los resultados mostrados en A, los valores se encuentran normalizados con respecto a GAPDH para cada caso. Los grupos TCL1 y LT muestran ser significativamente diferentes al aplicar el test de Mann-Whitney (P<0,002).

En función de los resultados vistos en la **Figura 15**, puede decirse que los ejemplares estudiados del modelo transgénico E μ -TCL1, parecen presentar una mayor expresión de LPL cuando se la compara con los ratones control *littermate*.

En efecto, el análisis semi-cuantitativo de los resultados de PCR a tiempo final mostrado en el panel B, revela que los grupos son significativamente distintos al aplicar el test de Mann-Whitney, obteniéndose un p-valor de $P < 0,002$. Sin embargo, antes de establecer conclusiones más generales al respecto sería necesario ampliar el número de ratones estudiados.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En función de los resultados obtenidos por la técnica de qPCR es posible concluir que se logró realizar la puesta a punto para la detección de LPL a nivel de ARNm en los pacientes con LLC, obteniendo diferencias claras entre la expresión de dicho gen al asociarse con el perfil mutacional de los genes IgV_H de los pacientes y por ende con el correspondiente pronóstico de evolución para la enfermedad. Asimismo, si bien la cantidad de pacientes analizados no fue alta, fue posible definir un punto de corte óptimo que permite establecer a partir de qué nivel de expresión se podría considerar pertinente asegurar que el paciente con LLC presenta una sobreexpresión de LPL y por lo tanto un pronóstico desfavorable. En resumen, los diversos trabajos reportados en la literatura a los que se ha hecho referencia, y lo mostrado en el presente trabajo, permiten concluir *que LPL es un buen marcador pronóstico para la LLC, en donde su sobreexpresión se asocia a la forma no mutada de los genes IgV_H y por lo tanto, a una mala progresión de la enfermedad.*

Con respecto al estudio realizado por citometría de flujo para la detección de LPL a nivel de proteína, se desprende el valor potencial como marcador pronóstico para la LLC. Sin embargo, el número de pacientes analizados para este estudio debería ser aumentado, sobre todo porque a diferencia de la evaluación a nivel de ARNm, se encuentran pocos datos a nivel bibliográfico con los cuales contrastar los obtenidos en este trabajo. A pesar de ello fue posible comparar de forma exitosa la expresión de LPL por qPCR y CF para pacientes representativos, así como también determinar que los grupos de pacientes separados en función de su perfil IgV_H presentan diferencias significativas de la expresión de dicha proteína. Es por eso que, *los resultados obtenidos son sin lugar a dudas prometedores y abren la perspectiva de poder llegar a establecer a futuro a LPL como un marcador proteico para la LLC, con los beneficios que de ello reportaría al momento de una posible aplicación en la clínica hematológica.*

Por último, en lo pertinente al estudio realizado de la expresión de LPL en el modelo transgénico murino $E\mu$ -TCL1, mediante PCR a tiempo final, fue posible determinar que dicho gen parece encontrarse más expresado en el modelo transgénico al compararse con ratones *littermate*. *En resumen, se concluye que el patrón de expresión de LPL en los ratones transgénicos del modelo $E\mu$ -TCL1 que emula una LLC progresora revela una mayor expresión del gen de dicha proteína, al compararla con la determinada para ratones con fenotipo normal (*littermate*). Estudios posteriores sobre la importancia de este hallazgo, así como su correlación con la biología de la enfermedad en los humanos deberán ser llevados a cabo.*



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] G. Dighiero and T. J. Hamblin, "Chronic lymphocytic leukaemia.," *Lancet*, vol. 371, no. 9617, pp. 1017–29, Mar. 2008.
- [2] S. Bianchi, G. Dighiero, and O. Pritsch, "Selected topics in Chronic Lymphocytic Leukemia". *InTech*, pp. 3–19, Sep. 2012.
- [3] F. Bezares, I. Slavutsky, R. Gabus, M. Giordano and P. Oppezzo "Leucemia Linfática Crónica. Las neoplasias linfoides." *Buenos Aires*, pp. 27–48, 2009.
- [4] J. Cuttner, "Increased incidence of hematologic malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia.," *Cancer Invest.*, vol. 10, no. 2, pp. 103–9, Jan. 1992.
- [5] A. C. Rawstron, M. J. Green, A. Kuzmicki, B. Kennedy, J. A. L. Fenton, P. A. S. Evans, S. J. M. O'Connor, S. J. Richards, G. J. Morgan, A. S. Jack, and P. Hillmen, "Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of 'indolent' chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts.," *Blood*, vol. 100, no. 2, pp. 635–9, Jul. 2002.
- [6] N. Chiorazzi, "Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells.," *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, vol. 20, no. 3, pp. 399–413, Sep. 2007.
- [7] F. Palacios, P. Moreno, P. Morande, C. Abreu, A. Correa, V. Porro, A. I. Landoni, R. Gabus, M. Giordano, G. Dighiero, O. Pritsch, and P. Oppezzo, "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*, vol. 115, no. 22, pp. 4488–4496, 2010.
- [8] C. Pepper, R. Ward, T. T. Lin, P. Brennan, J. Starczynski, M. Musson, C. Rowntree, P. Bentley, K. Mills, G. Pratt, and C. Fegan, "Highly purified CD38+ and CD38- sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin.," *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K.*, vol. 21, pp. 687–696, 2007.
- [9] C. Calissano, R. N. Damle, S. Marsilio, X.-J. Yan, S. Yancopoulos, G. Hayes, C. Emson, E. J. Murphy, M. K. Hellerstein, C. Sison, M. S. Kaufman, J. E. Kolitz, S. L. Allen, K. R. Rai, I. Ivanovic, I. M. Dozmorov, S. Roa, M. D. Scharff, W. Li, and N. Chiorazzi, "Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells.," *Mol. Med.*, vol. 17, no. December, pp. 1374–82, 2011.
- [10] J.-L. Binet, F. Caligaris-Cappio, D. Catovsky, B. Cheson, T. Davis, G. Dighiero, H. Döhner, M. Hallek, P. Hillmen, M. Keating, E. Montserrat, T. J. Kipps, and K. Rai, "Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia.," *Blood*, vol. 107, no. 3, pp. 859–61, Feb. 2006.

- [11] E. J. Moreau, E. Matutes, R. P. A'Hern, A. M. Morilla, R. M. Morilla, K. A. Owusu-Ankomah, B. K. Seon, and D. Catovsky, "Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b).," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 108, no. 4, pp. 378–82, Oct. 1997.
- [12] T. Ternynck, G. Dighiero, J. Follezou, and J. L. Binet, "Comparison of normal and CLL lymphocyte surface Ig determinants using peroxidase-labeled antibodies. I. Detection and quantitation of light chain determinants.," *Blood*, vol. 43, no. 6, pp. 789–95, Jun. 1974.
- [13] G. Dighiero, J. Y. Follezou, J. P. Roisin, T. Ternynck, and J. L. Binet, "Comparison of normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocyte surface Ig determinants using peroxidase-labeled antibodies. II. quantification of light chain determinants in atypical lymphocytic leukemia.," *Blood*, vol. 48, no. 4, pp. 559–66, Oct. 1976.
- [14] J. L. Binet, M. Leparrier, G. Dighiero, D. Charron, G. Vaugier, H. M. Beral, J. C. Natali, M. Raphael, B. Nizet, and J. Y. Follezou, "A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. Prognostic significance," *Cancer*, vol. 40, no. 2, pp. 855–864, Aug. 1977.
- [15] K. R. Rai and T. Han, "Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia.," *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 4, no. 2, pp. 447–56, Apr. 1990.
- [16] T. J. Hamblin, "Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia.," *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, vol. 20, no. 3, pp. 455–68, Sep. 2007.
- [17] H. Döhner, S. Stilgenbauer, A. Benner, E. Leupolt, A. Kröber, L. Bullinger, K. Döhner, M. Bentz, and P. Lichter, "Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 343, no. 26, pp. 1910–6, Dec. 2000.
- [18] T. Zenz, D. Mertens, R. Küppers, H. Döhner, and S. Stilgenbauer, "From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 1, pp. 37–50, Jan. 2010.
- [19] K. Lin, P. D. Sherrington, M. Dennis, Z. Matrai, J. C. Cawley, and A. R. Pettitt, "Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia.," *Blood*, vol. 100, no. 4, pp. 1404–9, Aug. 2002.
- [20] B. Austen, J. E. Powell, A. Alvi, I. Edwards, L. Hooper, J. Starczynski, A. M. R. Taylor, C. Fegan, P. Moss, and T. Stankovic, "Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL.," *Blood*, vol. 106, no. 9, pp. 3175–82, Nov. 2005.
- [21] H. Döhner, S. Stilgenbauer, K. Döhner, M. Bentz, and P. Lichter, "Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis.," *J. Mol. Med. (Berl.)*, vol. 77, no. 2, pp. 266–81, Feb. 1999.
- [22] S. Kalachikov, A. Migliazza, E. Cayanis, N. S. Fracchiolla, M. F. Bonaldo, L. Lawton, P. Jelenc, X. Ye, X. Qu, M. Chien, R. Hauptschein, G. Gaidano, U. Vitolo, G. Saglio, L. Resegotti, V. Brodjansky, N. Yankovsky, P. Zhang, M. B. Soares, J. Russo, I. S. Edelman, A. Efstratiadis, R. Dalla-Favera, and S. G. Fischer, "Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia.," *Genomics*, vol. 42, no. 3, pp. 369–77, Jun. 1997.

- [23] Y. Liu, M. Corcoran, O. Rasool, G. Ivanova, R. Ibbotson, D. Grandér, A. Iyengar, A. Baranova, V. Kashuba, M. Merup, X. Wu, A. Gardiner, R. Mullenbach, A. Poltarau, A. L. Hultström, G. Juliusson, R. Chapman, M. Tiller, F. Cotter, G. Gahrton, N. Yankovsky, E. Zabarovsky, S. Einhorn, and D. Oscier, "Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia.," *Oncogene*, vol. 15, no. 20, pp. 2463–73, Nov. 1997.
- [24] A. Migliazza, F. Bosch, H. Komatsu, E. Cayanis, S. Martinotti, E. Toniato, E. Guccione, X. Qu, M. Chien, V. V Murty, G. Gaidano, G. Inghirami, P. Zhang, S. Fischer, S. M. Kalachikov, J. Russo, I. Edelman, A. Efstratiadis, and R. Dalla-Favera, "Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia.," *Blood*, vol. 97, no. 7, pp. 2098–104, Apr. 2001.
- [25] G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, and C. M. Croce, "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 24, pp. 15524–9, Dec. 2002.
- [26] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, and T. Tuschl, "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs.," *Science*, vol. 294, no. 5543, pp. 853–8, Oct. 2001.
- [27] U. Klein, M. Lia, M. Crespo, R. Siegel, Q. Shen, T. Mo, A. Ambesi-Impiombato, A. Califano, A. Migliazza, G. Bhagat, and R. Dalla-Favera, "The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia.," *Cancer Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 28–40, Jan. 2010.
- [28] D. Winkler, C. Schneider, A. Kröber, L. Pasqualucci, P. Lichter, H. Döhner, and S. Stilgenbauer, "Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL).," *Leukemia*, vol. 19, no. 7, pp. 1211–5, Jul. 2005.
- [29] H. W. Schroeder and G. Dighiero, "The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire.," *Immunol. Today*, vol. 15, no. 6, pp. 288–94, Jun. 1994.
- [30] T. J. Hamblin, Z. Davis, A. Gardiner, D. G. Oscier, and F. K. Stevenson, "Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia.," *Blood*, vol. 94, no. 6, pp. 1848–54, Sep. 1999.
- [31] R. N. Damle, T. Wasil, F. Fais, F. Ghiotto, A. Valetto, S. L. Allen, A. Buchbinder, D. Budman, K. Dittmar, J. Kolitz, S. M. Lichtman, P. Schulman, V. P. Vinciguerra, K. R. Rai, M. Ferrarini, and N. Chiorazzi, "Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.," *Blood*, vol. 94, no. 6, pp. 1840–7, Sep. 1999.
- [32] F. Bosch and N. Villamor, "ZAP-70 expression in CLL: a new parameter for an old disease.," *Haematologica*, vol. 88, no. 7, pp. 724–6, Jul. 2003.
- [33] U. Klein, Y. Tu, G. A. Stolovitzky, M. Mattioli, G. Cattoretti, H. Husson, A. Freedman, G. Inghirami, L. Cro, L. Baldini, A. Neri, A. Califano, and R. Dalla-Favera, "Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous

- phenotype related to memory B cells.” *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 11, pp. 1625–38, Dec. 2001.
- [34] A. Rosenwald, A. A. Alizadeh, G. Widhopf, R. Simon, R. E. Davis, X. Yu, L. Yang, O. K. Pickeral, L. Z. Rassenti, J. Powell, D. Botstein, J. C. Byrd, M. R. Grever, B. D. Cheson, N. Chiorazzi, W. H. Wilson, T. J. Kipps, P. O. Brown, and L. M. Staudt, “Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia.” *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 11, pp. 1639–47, Dec. 2001.
- [35] Y. Vasconcelos, J. De Vos, L. Vallat, T. Rème, a I. Lalanne, K. Wanherdrick, A. Michel, F. Nguyen-Khac, P. Oppezco, C. Magnac, K. Maloum, F. Ajchenbaum-Cymbalista, X. Troussard, M. Leparrier, B. Klein, G. Dighiero, and F. Davi, “Gene expression profiling of chronic lymphocytic leukemia can discriminate cases with stable disease and mutated Ig genes from those with progressive disease and unmutated Ig genes.” *Leukemia*, vol. 19, no. 11, pp. 2002–5, Nov. 2005.
- [36] R. Rosenquist, D. Cortese, S. Bhoi, L. Mansouri, and R. Gunnarsson, “Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia where do we stand ?,” vol. 54, no. February, pp. 2351–2364, 2013.
- [37] C. Moreno and E. Montserrat, “New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia.” *Blood Rev.*, vol. 22, no. 4, pp. 211–9, Jul. 2008.
- [38] T. Seiler, H. Döhner, and S. Stilgenbauer, “Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia.” *Semin. Oncol.*, vol. 33, no. 2, pp. 186–94, Apr. 2006.
- [39] R. Letestu, N. Boeckx, S. Böttcher, A. Buhl, P. Ghia, R. Ibbotson, M. Legarff-Tavernier, A. Morilla, R. Padmore, A. Rawstron, H. Roudot, M. Shehata, P. Smolewski, P. Staib, B. Stamatopoulos, M. Ticchioni, N. Villamor, and F. Cymbalista, “International effort for harmonization of ZAP-70 technique: contribution of the exchange of electronic flow cytometry raw-data and multicentric evaluation of a standardized procedure,” *Haematologica*, vol. 94, no. Supplement, pp. 1–95, 2009.
- [40] P. Oppezco, Y. Vasconcelos, C. Settegrana, D. Jeannel, F. Vuillier, M. Legarff-Tavernier, E. Y. Kimura, S. Bechet, G. Dumas, M. Brissard, H. Merle-Béral, M. Yamamoto, G. Dighiero, and F. Davi, “The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia.” *Blood*, vol. 106, no. 2, pp. 650–7, Jul. 2005.
- [41] M. A. Kaderi, M. Kanduri, A. M. Buhl, M. Sevov, N. Cahill, R. Gunnarsson, M. Jansson, K. E. Smedby, H. Hjalgrim, J. Jurlander, G. Juliusson, L. Mansouri, and R. Rosenquist, “LPL is the strongest prognostic factor in a comparative analysis of RNA-based markers in early chronic lymphocytic leukemia.” *Haematologica*, vol. 96, no. 8, pp. 1153–60, Aug. 2011.
- [42] B. Stamatopoulos, N. Meuleman, C. de Bruyn, K. Pieters, G. Anthoine, P. Mineur, D. Bron, and L. Lagneaux, “A molecular score by quantitative PCR as a new prognostic tool at diagnosis for chronic lymphocytic leukemia patients,” *PLoS One*, vol. 5, no. 9, pp. 1–12, Jan. 2010.
- [43] J. Peterson, W. Y. Fujimoto, and J. D. Brunzell, “Human lipoprotein lipase: relationship of activity, heparin affinity, and conformation as studied with monoclonal antibodies.” *J. Lipid Res.*, vol. 33, pp. 1165–1170, 1992.

- [44] K. Preiss-Landl, R. Zimmermann, G. Hämmerle, and R. Zechner, "Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism.," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 13, no. 5, pp. 471–81, Oct. 2002.
- [45] J. R. Mead, S. A. Irvine, and D. P. Ramji, "Lipoprotein lipase structure, function, regulation, and role in disease," pp. 753–769, 2002.
- [46] V. Murthy, P. Julien, and C. Gagne, "Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene.," *Pharmacol. Ther.*, vol. 70, no. 2, pp. 101–35, Jan. 1996.
- [47] S. Yamamoto, Y. Higuchi, K. Yoshiyama, E. Shimizu, M. Kataoka, N. Hijiya, and K. Matsuura, "ADAM family proteins in the immune system.," *Immunol. Today*, vol. 20, no. 6, pp. 278–84, Jun. 1999.
- [48] P. Primakoff and D. G. Myles, "The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity.," *Trends Genet.*, vol. 16, no. 2, pp. 83–7, Feb. 2000.
- [49] D. P. Cerretti, R. F. DuBose, R. A. Black, and N. Nelson, "Isolation of two novel metalloproteinase-disintegrin (ADAM) cDNAs that show testis-specific gene expression.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 263, no. 3, pp. 810–5, Oct. 1999.
- [50] A. Wiestner, A. Rosenwald, T. S. Barry, G. Wright, R. E. Davis, S. E. Henrickson, H. Zhao, R. E. Ibbotson, J. A. Orchard, Z. Davis, M. Stetler-Stevenson, M. Raffeld, D. C. Arthur, G. E. Marti, W. H. Wilson, T. J. Hamblin, D. G. Oscier, and L. M. Staudt, "ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile.," *Blood*, vol. 101, no. 12, pp. 4944–51, Jun. 2003.
- [51] D. Heintel, D. Kienle, M. Shehata, a Kröber, E. Kroemer, I. Schwarzinger, D. Mitteregger, T. Le, a Gleiss, C. Mannhalter, a Chott, J. Schwarzmeier, C. Fonatsch, a Gaiger, H. Döhner, S. Stilgenbauer, and U. Jäger, "High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia.," *Leukemia*, vol. 19, no. 7, pp. 1216–23, Jul. 2005.
- [52] M. B. van't Veer, A. M. Brooijmans, A. W. Langerak, B. Verhaaf, C. S. Goudswaard, W. J. Graveland, K. van Lom, and P. J. M. Valk, "The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia.," *Haematologica*, vol. 91, no. 1, pp. 56–63, Jan. 2006.
- [53] K. Maloum, C. Settegrana, E. Chapiro, B. Cazin, S. Leprêtre, A. Delmer, M. Leporrier, B. Dreyfus, O. Tournilhac, B. Mahe, F. Nguyen-Khac, C. Lesty, F. Davi, and H. Merle-Béral, "IGHV gene mutational status and LPL/ADAM29 gene expression as clinical outcome predictors in CLL patients in remission following treatment with oral fludarabine plus cyclophosphamide.," *Ann. Hematol.*, vol. 88, no. 12, pp. 1215–21, Dec. 2009.
- [54] W. Xu, J.-Y. Li, Q.-D. Shen, Y.-J. Wu, H. Yu, and L. Fan, "Expression level of lipoprotein lipase in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia and its correlation with other prognostic factors.," *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 31, no. 5, pp. 552–9, Oct. 2009.
- [55] F. Van Bockstaele, V. Pede, A. Janssens, F. Callewaert, F. Offner, B. Verhasselt, and J. Philippé, "Lipoprotein lipase mRNA expression in whole blood is a prognostic marker in

- B cell chronic lymphocytic leukemia.," *Clin. Chem.*, vol. 53, no. 2, pp. 204–12, Feb. 2007.
- [56] P. Moreno, C. Abreu, M. Borge, F. Palacios, P. Morande, M. Pegazzano, S. Bianchi, A. I. Landoni, R. Agrelo, M. Giordano, G. Dighiero, R. Gamberale, and P. Oppezzo, "Lipoprotein lipase expression in unmutated CLL patients is the consequence of a demethylation process induced by the microenvironment.," *Leukemia*, vol. 27, no. 3, pp. 721–5, Mar. 2013.
- [57] F. Brenet, M. Moh, P. Funk, E. Feierstein, A. J. Viale, N. D. Socci, and J. M. Scandura, "DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing.," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, p. e14524, Jan. 2011.
- [58] M. Watanabe, Y. Ogawa, K. Itoh, T. Koiwa, M. E. Kadin, T. Watanabe, I. Okayasu, M. Higashihara, and R. Horie, "Hypomethylation of CD30 CpG islands with aberrant JunB expression drives CD30 induction in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma.," *Lab. Invest.*, vol. 88, no. 1, pp. 48–57, Jan. 2008.
- [59] M. Bilban, D. Heintzel, T. Scharl, T. Woelfel, M. M. Auer, E. Porpaczy, B. Kainz, A. Kröber, V. J. Carey, M. Shehata, C. Zielinski, W. Pickl, S. Stilgenbauer, A. Gaiger, O. Wagner, and U. Jäger, "Deregulated expression of fat and muscle genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia with high lipoprotein lipase expression.," *Leukemia*, vol. 20, no. 6, pp. 1080–8, Jun. 2006.
- [60] K. Wong and R. O. Ryan, "Characterization of apolipoprotein A-V structure and mode of plasma triacylglycerol regulation.," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 18, no. 3, pp. 319–24, Jun. 2007.
- [61] C. P. Pallasch, J. Schwamb, S. Königs, a Schulz, S. Debey, D. Kofler, J. L. Schultze, M. Hallek, a Ultsch, and C.-M. Wendtner, "Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells.," *Leukemia*, vol. 22, no. 3, pp. 585–92, Mar. 2008.
- [62] M. Montillo, T. Hamblin, M. Hallek, E. Montserrat, and E. Morra, "Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies.," *Haematologica*, vol. 90, no. 3, pp. 391–9, Mar. 2005.
- [63] P. E. M. Patten, A. G. S. Buggins, J. Richards, A. Wotherspoon, J. Salisbury, G. J. Mufti, T. J. Hamblin, and S. Devereux, "CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment.," *Blood*, vol. 111, no. 10, pp. 5173–81, May 2008.
- [64] G. Gibbs, T. Bromidge, D. Howe, J. Hopkins, and S. Johnson, "Comparison of flow cytometric methods for the measurement of ZAP-70 expression in a routine diagnostic laboratory.," *Clin. Lab. Haematol.*, vol. 27, no. 4, pp. 258–66, Aug. 2005.
- [65] S. Kay, Y. Herishanu, M. Pick, O. Rogowski, S. Baron, E. Naparstek, A. Polliack, and V. R. Deutsch, "Quantitative flow cytometry of ZAP-70 levels in chronic lymphocytic leukemia using molecules of equivalent soluble fluorochrome.," *Cytometry B. Clin. Cytom.*, vol. 70, no. 4, pp. 218–26, Jul. 2006.

- [66] C. Wilhelm, A. Neubauer, and C. Brendel, "Discordant results of flow cytometric ZAP-70 expression status in B-CLL samples if different gating strategies are applied.," *Cytometry B. Clin. Cytom.*, vol. 70, no. 4, pp. 242–50, Jul. 2006.
- [67] L. Virgilio, M. G. Narducci, M. Isobe, L. G. Billips, M. D. Cooper, C. M. Croce, and G. Russo, "Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, no. 26, pp. 12530–12534, Dec. 1994.
- [68] C. Hallas, Y. Pekarsky, T. Itoyama, J. Varnum, R. Bichi, J. L. Rothstein, and C. M. Croce, "Genomic analysis of human and mouse TCL1 loci reveals a complex of tightly clustered genes," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, no. 25, pp. 14418–14423, Dec. 1999.
- [69] Y. Pekarsky, C. Hallas, M. Isobe, G. Russo, and C. M. Croce, "Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, no. 6, pp. 2949–2951, Mar. 1999.
- [70] M. G. Narducci, M. T. Fiorenza, S. Kang, A. Bevilacqua, M. Di Giacomo, D. Remotti, M. C. Picchio, V. Fidanza, M. D. Cooper, C. M. Croce, F. Mangia, and G. Russo, "TCL1 participates in early embryonic development and is overexpressed in human seminomas.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 18, pp. 11712–7, Sep. 2002.
- [71] S. Kang, M. G. Narducci, C. Lazzeri, A. M. Mongiovi, E. Caprini, A. Bresin, F. Martelli, J. Rothstein, C. M. Croce, M. D. Cooper, and G. Russo, "Impaired T- and B-cell development in Tc11-deficient mice.," *Blood*, vol. 105, no. 3, pp. 1288–94, Feb. 2005.
- [72] J. Takizawa, R. Suzuki, H. Kuroda, A. Utsunomiya, Y. Kagami, T. Joh, Y. Aizawa, R. Ueda, and M. Seto, "Expression of the TCL1 gene at 14q32 in B-cell malignancies but not in adult T-cell leukemia.," *Jpn. J. Cancer Res.*, vol. 89, no. 7, pp. 712–8, Jul. 1998.
- [73] M. G. Narducci, E. Pescarmona, C. Lazzeri, S. Signoretti, A. M. Lavinia, D. Remotti, E. Scala, C. D. Baroni, A. Stoppacciaro, C. M. Croce, and G. Russo, "Regulation of TCL1 expression in B- and T-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues.," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 8, pp. 2095–100, Apr. 2000.
- [74] J. Laine, G. Künstle, T. Obata, M. Sha, and M. Noguchi, "The Protooncogene TCL1 Is an Akt Kinase Coactivator," *Mol. Cell*, vol. 6, no. 2, pp. 395–407, Aug. 2000.
- [75] Y. Pekarsky, A. Koval, C. Hallas, R. Bichi, M. Tresini, S. Malstrom, G. Russo, P. Tschlis, and C. M. Croce, "Tc11 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 7, pp. 3028–3033, Mar. 2000.
- [76] T. O. Chan, S. E. Rittenhouse, and P. N. Tschlis, "AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 68, pp. 965–1014, Jan. 1999.
- [77] A. Palamarchuk, P. S. Yan, N. Zanesi, L. Wang, B. Rodrigues, M. Murphy, V. Balatti, A. Bottoni, N. Nazaryan, H. Alder, L. Rassenti, T. J. Kipps, M. Freitas, C. M. Croce, and Y. Pekarsky, "Tc11 protein functions as an inhibitor of de novo DNA methylation in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL).," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 7, pp. 2555–60, Feb. 2012.
- [78] M. Herling, K. A. Patel, N. Weit, N. Lilienthal, M. Hallek, M. J. Keating, and D. Jones, "High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse

- outcome in chronic lymphocytic leukemia.” *Blood*, vol. 114, no. 21, pp. 4675–86, Nov. 2009.
- [79] A. Schrader, W. Popal, N. Lilienthal, G. Crispatzu, P. Mayer, D. Jones, M. Hallek, and M. Herling, “AKT-pathway inhibition in chronic lymphocytic leukemia reveals response relationships defined by TCL1.” *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 14, no. 8, pp. 700–12, Jan. 2014.
- [80] R. Bichi, S. a Shinton, E. S. Martin, A. Koval, G. a Calin, R. Cesari, G. Russo, R. R. Hardy, and C. M. Croce, “Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 10, pp. 6955–60, May 2002.
- [81] X. Yan, E. Albesiano, N. Zanesi, S. Yancopoulos, A. Sawyer, E. Romano, A. Petlickovski, D. G. Efremov, C. M. Croce, and N. Chiorazzi, “B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 31, pp. 11713–8, Aug. 2006.
- [82] M. J. Kyasa, L. Hazlett, R. S. Parrish, S. A. Schichman, and C. S. Zent, “Veterans with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) have a markedly increased rate of second malignancy, which is the most common cause of death.” *Leuk. Lymphoma*, vol. 45, no. 3, pp. 507–13, Mar. 2004.
- [83] K. Parekh, V. Rusch, and M. Kris, “The clinical course of lung carcinoma in patients with chronic lymphocytic leukemia.” *Cancer*, vol. 86, no. 9, pp. 1720–3, Nov. 1999.
- [84] N. Zanesi, R. Aqeilan, A. Drusco, M. Kaou, C. Sevigiani, S. Costinean, L. Bortesi, G. La Rocca, P. Koldovsky, S. Volinia, R. Mancini, G. Calin, C. P. Scott, Y. Pekarsky, and C. M. Croce, “Effect of rapamycin on mouse chronic lymphocytic leukemia and the development of nonhematopoietic malignancies in Emu-TCL1 transgenic mice.” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 2, pp. 915–20, Jan. 2006.
- [85] A. J. Johnson, D. M. Lucas, N. Muthusamy, L. L. Smith, R. B. Edwards, M. D. De Lay, C. M. Croce, M. R. Grever, and J. C. Byrd, “Characterization of the TCL-1 transgenic mouse as a preclinical drug development tool for human chronic lymphocytic leukemia.” *Blood*, vol. 108, no. 4, pp. 1334–8, Aug. 2006.
- [86] P. Chomczynski, “A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples.” *Biotechniques*, vol. 15, no. 3, pp. 532–4, 536–7, Oct. 1993.
- [87] H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen, and F. Vitzthum, “Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications.” *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 12, p. e103, Jan. 2004.
- [88] M. Noguchi, V. Ropars, C. Roumestand, and F. Suizu, “Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt.” *FASEB J.*, vol. 21, no. 10, pp. 2273–84, Aug. 2007.