



Modificaciones en la ultraestructura de las células B de pacientes con leucemia linfoide crónica e inmuno-localización de la Lipoprotein lipasa



Estefanía Sicco

Tutora: Gabriela Casanova Co-tutor: Daniel Prieto

Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión Facultad de Ciencias Universidad de la República

Agosto 2015

ÍNDICE

Resumen	2
Introducción	4
Generalidades	4
Epidemiología	4
Diagnóstico	5
Clasificación anátomo-clínica	6
Fisiopatología: Linfocito B: LLC como modelo inmunológico	8
Marcadores pronóstico de la LLC	10
LPL como marcador pronóstico de la LLC	12
Objetivos	14
Materiales y métodos	15
Elección de la cohorte	15
Obtención de la muestra	16
Microscopía de transmisión	17
Técnica de rutina	17
Técnica de procesamiento de muestras para inmuno-MET	19
Inmunodetección con partículas de oro coloidal	20
Cuantificación y análisis estadístico	21
Resultados	22
Análisis ultraestructural de las células B en pacientes con LLC	22
Morfología celular y nuclear	22
Anatomía microscópica de las cisternas perinucleares, del	
retículo endoplasmático rugoso y del aparato de Golgi	26
Tamaño y distribución de las mitocondrias	35
Presencia de centríolos y vesículas	35
Primer acercamiento a la localización de la LPL	41
Discusión	45
Conclusión	50
Bibliografía	51

RESUMEN

La leucemia linfoide crónica se caracteriza por un aumento paulatino de células B en sangre periférica, que evadieron la apoptosis y se detuvieron en la fase G0/G1 del ciclo celular. Esto resulta de un complejo equilibrio entre la activación de la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis, siendo un proceso multifásico que ocurre principalmente a nivel subcelular.

Basados en este hecho, se realizó el análisis de las alteraciones subcelulares presentes en células tumorales de pacientes con LLC, empleando microscopía electrónica de transmisión. Para ello se trabajó con células B obtenidas de dos grupos de pacientes: indolentes (como grupo control) y progresores, a fin de determinar con mayor precisión si existía o no una morfología subcelular diferencial entre ambos grupos.

El análisis de las células B leucémicas, realizado mediante MET, reveló que las mismas presentan características ultraestructurales propias. Estas incluyen alteraciones subcelulares tanto en la organización celular interna como a nivel de la membrana plasmática. Los resultados parecen indicar que si bien los linfocitos de ambos grupos comparten algunos aspectos de su estructura celular, los correspondientes al grupo de pacientes progresores exhiben características distintivas, las cuales podrían ayudar al diagnóstico y caracterización de la LLC.

Para complementar los datos obtenidos del análisis de la morfología subcelular, se realizaron ensayos mediante inmuno-MET, con el fin de determinar la localización intracelular de la Lipoprotein lipasa en dichas células. Si bien se trata de resultados preliminares, los mismos sugieren que en el paciente progresor, la LPL se encuentra retenida principalmente en las cisternas del RER.

La presencia de elementos diferenciales en la morfología ultraestructural, denota la existencia de modificaciones funcionales. La identificación sistemática de alteraciones sub-celulares características de la LLC, así como la detección de LPL a nivel intracelular, permitirían proponer su empleo como elementos pronósticos tempranos de la progresión tumoral. **Palabras claves:** Células B, Leucemia linfoide crónica, Lipoprotein lipasa, Ultraestructura de células B, Inmuno-localización de la lipoprotein lipasa.

Abreviaturas:

- **LLC:** Leucemia linfoide crónica.
- **LPL:** Lipoprotein lipasa.
- MET: Microscopía electrónica de transmisión.

INTRODUCCÓN

GENERALIDADES

La leucemia linfoide crónica (LLC) es una neoplasia de etiología desconocida caracterizada por la acumulación paulatina pero progresiva de linfocitos B clonales con fenotipo maduro en sangre periférica, médula ósea y órganos linfáticos secundarios. Es la leucemia más frecuente en la población occidental y usualmente afecta a los adultos mayores de 50 años (Dighiero et al., 2008), siendo la edad promedio para su diagnóstico de 70 años para los hombres y 74 años para las mujeres (Bianchi et al., 2012). La evolución de esta enfermedad presenta un curso sumamente variable, con pacientes que presentan un rango de sobrevida que oscila entre meses y décadas. (Dighiero et al., 2008). Los tratamientos disponibles hasta el momento pueden inducir la remisión de la enfermedad, pero la mayoría de los pacientes indefectiblemente recaen, por lo que esta patología al día de hoy es considerada incurable (Burger et al., 2009).

EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia anual de la LLC varía según el sexo y la edad de la población en estudio. En Estados Unidos se estima una incidencia de 3,5 casos cada 100.000 habitantes pero en el Reino Unido se registran estimaciones de 6 casos cada 100.000 habitantes (Bianchi et al., 2012). Estudios realizados en Uruguay revelan semejanzas con los porcentajes de la tasa de incidencia de LLC de Europa occidental. Para nuestro país, en la población adulta, dicha tasa oscila en el entorno de 4,5 casos por año cada 100.000 habitantes. La edad promedio es de 72 años, en un rango que oscila entre 35 y 90 años, con una relación aproximada de 2:1 en hombres con respecto a mujeres (Bezares et al., 2009). En países asiáticos sin embargo, la incidencia de la LLC es alrededor de cinco veces menor en comparación con la observada en los países occidentales (Tamura et al., 2001). A pesar de dichas observaciones, no existen evidencias consistentes para considerar que exista una relación directa entre la predisposición a la enfermedad y el medio ambiente (Dighiero et al., 2008). Excepto en el caso de

trabajadores expuestos a herbicidas agrícolas, tampoco se dispone de evidencias sólidas para vincular el desencadenamiento de esta enfermedad como resultante de la exposición ambiental a productos químicos o a radiación (Dighiero et al., 2008).

Por otro lado, sí se ha establecido la existencia de una asociación entre factores genéticos hereditarios y la etiología de la LLC (Sellick et al., 2006). A pesar de que la naturaleza de esta predisposición genética aún se desconoce (Dighiero et al., 2008), se ha determinado que los familiares de primer grado del paciente con LLC son tres veces más propensos a padecer la enfermedad o alguna otra neoplasia linfoide que la población en general (Cuttner, 1992). De acuerdo con esto, en 2002 Rawstron y colaboradores describieron que el 3,5% de los individuos normales por encima de los 40 años poseen una población de linfocitos monoclonales con las características de las células de la LLC, mientras que en los familiares cercanos a individuos con LLC dicho porcentaje se encuentra entre el 13,5 y 18%. Por lo que los factores genéticos hereditarios influyen en el desarrollo de la enfermedad (Rawstron et al., 2002).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico de la LLC requiere que el hemograma realizado al paciente, por lo general asintomático, alcance una linfocitosis absoluta con un umbral de al menos 5000 linfocitos maduros por microlitro de sangre periférica. Estos linfocitos a su vez, presentan un inmunofenotipo característico (Figura 1), lo cual ha facilitado el diagnóstico. En general estas características distinguen la LLC de otras enfermedades linfoproliferativas, por ejemplo, del linfoma de las células del manto y del linfoma esplénico de la zona marginal; enfermedades que son similares a la LLC (Dighiero et al., 2008; Ginaldi et al., 1998). Las células de la LLC se caracterizan por co-expresar los antígenos de células T CD5 y el antígeno de superficie de las células B CD19, CD20 y CD23. Además, los niveles de inmunoglobulinas de membranas CD20 y CD79b son particularmente bajos comparados con aquellos encontrados en células B de donantes sanos (Ginaldi et al., 1998).



Figura 1. Diagnóstico diferencial mediante inmunofenotipo de linfocitos B en distintos desórdenes linfoproliferativos. Los rectángulos en rojo indican los inmunofenotipos empleados para el diagnóstico de la LLC (Figura tomada de Dighiero et al., 2008).

CLASIFICACIÓN ANÁTOMO-CLÍNICA

Se destacan dos criterios de clasificación anátomo-clínica de la LLC: el propuesto por Binet y colaboradores en 1977; y el elaborado por Rai y colaboradores en 1990.

El criterio de Binet clasifica a los pacientes en tres categorías en función de su pronóstico: bueno, intermedio y severo (estadios A, B y C, respectivamente). La clasificación se basa en las áreas involucradas del cuerpo y en el recuento de hemoglobina y plaquetas (Binet et al., 1977).

La otra clasificación es la elaborada por Rai y colaboradores, y comprende cinco categorías: 0, I, II, III y IV. Esta clasificación permite estratificar a los pacientes de bajo riesgo (estadio 0), con riesgo intermedio (estadio I o II) y con alto riesgo donde pueden presentar además anemia (estadio III) o poseer un porcentaje bajo de plaquetas: trombocitopenia (estadio IV) (Rai et al., 1990).

Ambos criterios de clasificación están directamente relacionados con la sobrevida del paciente. Para los pacientes en el estadio A de Binet o 0 de Rai, la sobrevida media es mayor a 10 años, mientras que para los estadios B de Binet o I-II de Rai se encuentra entre los 5-7 años. Pero para los estadios C de Binet o III-IV de Rai, la sobrevida disminuye aún más situándose entre 1 y 3 años aproximadamente (Hamblin, 2007).

Si bien ambas clasificaciones son usadas en la estratificación de la LLC, el criterio de Binet es el utilizado más frecuentemente en Europa y en parte de América del Sur, mientras que el criterio establecido por Rai se utiliza mayoritariamente en América del Norte. Los dos proponen un sistema simple, que permite tanto el diseño de estudios clínicos como de estrategias terapéuticas racionales. Sin embargo, ninguna de las dos clasificaciones permite pronosticar con certeza la evolución de los pacientes, sobre todo la de aquellos que se incluyen en los estadios iniciales de la enfermedad, en los que el tratamiento podría resultar más efectivo (Dighiero, 2003).

En la década de 1990, hubo importantes avances que permitieron conocer mejor los procesos evolutivos de la LLC. Uno de los trabajos pioneros fue el de Schroeder y Dighiero quienes, en 1994, sugirieron que la LLC es una enfermedad heterogénea donde el proceso tumoral puede originarse tanto en linfocitos B memoria como en linfocitos B vírgenes (Schroeder et al., 1994). Años más tarde, este concepto se reafirmó con los trabajos de Hamblin y colaboradores (1999) y Damle y colaboradores (1999). Ambos trabajos demostraron que el perfil mutacional de los genes VH del clon tumoral en la LLC podría ser el principal método pronóstico en este tipo de leucemia. Lo dicho es aceptado a nivel clínico, donde los pacientes con genes VH mutados (MUT), tienen un mejor pronóstico que los pacientes de LLC MUT fueron originalmente definidos como aquellos que tienen menos del 98% de identidad de secuencia con respecto a la línea germinal de los genes VH (Hamblin, 2007; Rosenquist et al, 2013).

La LLC es entonces una enfermedad heterogénea tanto a nivel clínico como molecular, lo que ha llevado a la generación de lo que se conoce como la hipótesis de los tres tercios, donde se clasifica a los pacientes con LLC de la siguiente manera: pacientes con una enfermedad indolente y estable; pacientes en los que la enfermedad progresará lentamente hacia una enfermedad más agresiva; y pacientes que presentan una enfermedad agresiva y requieren de tratamiento desde el inicio (Vasconcelos et al., 2003). Las diferencias entre estos tres tercios están asociadas a un delicado equilibrio entre poblaciones de células quiescentes y proliferantes del mismo clon leucémico en el mismo paciente (Chiorazzi, 2007).

FISIOPATOLOGÍA

LINFOCITO B: LLC COMO MODELO INMUNOLOGÍCO.

La célula que se encuentra afectada en la LLC, es el linfocito B. Esta célula es responsable de la inmunidad humoral, siendo la principal herramienta de la inmunidad adaptativa. Su función primordial es la defensa del huésped contra el ataque de patógenos, mediante la secreción de anticuerpos que reconocen las moléculas antigénicas de los patógenos (Prieto et al., 2013 a). Su receptor, llamado BCR (B Cell Receptor), está formado por un complejo multimérico: la inmunoglobulina (Ig) y el heterodímero Iga/Igβ (CD79a/CD79b), ambos anclados a la membrana celular. Este receptor les permite reconocer y responder a dichos antígenos, iniciando un programa de proliferación y diferenciación hacia células B plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas o anticuerpos (formas secretadas del BCR que neutralizan al patógeno) (Wang et al, 2013; Prieto et al., 2013 b).

Las células B se desarrollan en la médula ósea, donde sus precursores reordenan los genes que codifican para las cadenas pesada y ligera del BCR. Una vez que la célula B produce su receptor para el antígeno, si este es autorreactivo (es decir, que reacciona frente a péptidos presentes en otras células del propio individuo), se produce la edición del receptor o la anergia de la célula que lo produce. El estado de anergia tiene como resultado final la apoptosis de dicha célula (Prieto et al., 2013 b).

En la LLC se produce un aumento paulatino de los linficitos B clonales de fenotipo maduro que logran evadir dicha muerte celular programada y se detienen en la fase G0/G1 del ciclo celular (Bianchi et al., 2012). Estas células se diseminan por el torrente sanguíneo, pudiéndose acumular en la médula ósea y en órganos linfoides secundarios: bazo y ganglios linfáticos. Luego, pueden generar una lesión y convertirse en un tumor (Ferlay et al., 2012).

Esta acumulación de células B leucémicas es, entonces, el resultado de un complejo equilibrio entre la activación de la proliferación celular y la inhibición de la muerte apoptótica (Bianchi et al., 2012). Si bien estas células tienen una actividad proliferativa baja, investigaciones recientes indican que la evolución de la enfermedad podría depender del equilibrio relativo entre el pool acumulativo de células B y una fracción de proliferación más pequeña (Palacios, et al., 2015).

Las células B de LLC se caracterizan además por presentar una expresión elevada de dos proteínas: la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en ausencia de translocaciones específicas y la proteína p27kip1 (regulador negativo del ciclo celular). Esta última tiene un papel clave en la progresión del ciclo celular, por lo que su sobreexpresión en las células de la LLC podría ser responsable del incremento en el número de células B durante las primeras fases del ciclo celular (Vrhovac et al., 1998; Bianchi et al., 2012). Las proteínas anti-apoptóticas Bcl2 han sido consideradas moléculas claves en la sobrevida celular en pacientes con LLC (Cimmino et al, 2005).

Trabajos recientes mostraron que en pacientes con LLC, el BCR que llega a la membrana celular puede presentar diferentes formas de N-glicosilación en su región constante: madura o inmadura. Se cree que la glicosilación inmadura podría estar indicando una exposición frente al antígeno, y originando señales de sobrevida y proliferación, puesto que las variaciones en el perfil de glicosilación se observan también en células B normales luego de una estimulación del BCR (Krysov et al, 2010).

Por lo que el complejo equilibrio entre la activación de la proliferación celular y la inhibición de la muerte apoptótica es un proceso multifásico y ocurre principalmente a nivel subcelular (Ferlay et al., 2012).

Con el propósito de investigar los cambios a nivel subcelular en la LLC, se han realizado algunos estudios empleando microscopía electrónica de transmisión (MET). Los realizados hasta el momento, han revelado que las células tumorales son más pequeñas que las células normales y denotan alteraciones en la regularidad del perfil nuclear, el cual puede observarse circular, ovalado o indentado, pero siempre ubicado centralmente en el cuerpo celular (Wei et al., 1996). También se han descripto invaginaciones de la membrana plasmática, dilatación de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso (RER) y un aumento en el tamaño mitocondrial (Brajuskovic et al., 2004; Hirose et al. 1993). Wei y colaboradores, observaron además que las mitocondrias en ocasiones se disponen reunidas en un sector del citoplasma (Wei et al., 1996).

En contraste con lo que ocurre in vivo, los linfocitos B de LLC rápidamente mueren por apoptosis in vitro y en ausencia de células accesorias, lo que indica que el microambiente celular juega un papel esencial en la sobrevida de los linfocitos en pacientes con LLC (Caligaris-Cappio, 2003).

MARCADORES PRONÓSTICOS DE LA LLC

La necesidad de encontrar marcadores moleculares y celulares que puedan predecir la progresión de la LLC, ha llevado a que los científicos centren su atención en el estudio de la expresión génica diferencial entre linfocitos B normales y leucémicos, y entre los linfocitos con genes MUT y NM (Dighiero et al., 2008).

Como resultado de ello, se han propuesto numerosos marcadores con el objetivo de reemplazar el perfil mutacional de los genes de inmunoglobulina (IgV_H). Este método de análisis, si bien es muy eficiente, implica un conjunto de etapas y técnicas complejas, para las que se requieren equipamientos e instalaciones especiales que por lo general, no son de fácil acceso en todos hospitales (Dighiero et al., 2008; Bosch et al., 2003).

Según Moreno y Montserrat (Moreno et al., 2008) los marcadores pronósticos se pueden dividir en dos grandes grupos: los clásicos y los biológicos.

Los marcadores pronóstico clásicos son: **1**- la estratificación clínica (Clasificación de Binet o de Rai); **2**- el recuento linfocitario (diagnostico durante el estudio de Bient o Rai); **3**- la morfología de los linfocitos obtenida de sangre periférica (diagnóstico durante el estudio de Bient o Rai); **4**- el tiempo de duplicación linfocitaria (definido como el número de meses que le lleva a los linfocitos a doblar su número absoluto); y **5**- el grado de infiltración en la médula ósea (determinado mediante la histología medular).

Los marcadores pronósticos biológicos se pueden subdividir en tres grandes grupos: **1**- los marcadores genéticos (perfil mutacional de los genes VH y aberraciones cromosómicas); **2**- la expresión anómala de genes en linfocitos leucémicos (a nivel de ARNm, microRNAs y proteínas); **3**- las proteínas presentes en el suero.

Se ha descubierto un conjunto de moléculas que pueden estar asociadas con el perfil mutacional de los genes IgV_H. Las mismas se esquematizan en la figura 2. Se observa que mutaciones activadoras en NOTCH1, así como las supresoras de la función en BIRC, conducen a potenciar la vía de señalización NFKB y de esa manera inducir la proliferación de las células B de pacientes con LLC NM. Por otro lado, ZAP70 está involucrado en la vía de señalización del BCR y su sobreexpresión potencia la proliferación por NFKB. Además, la supresión de TP53 por deleciones o mutaciones en los NM produce un aumento de la sobrevida celular. Otra proteína que está asociada al perfil mutacional de los genes IgV_H es la lipoprotein lipasa (LPL), y a pesar de que aún no conocerse las razones por las que hay una expresión elevada de la misma en pacientes con mal pronóstico, en los últimos años se ha demostrado que dicha sobreexpresión constituye un buen marcador pronóstico debido a su correlación con una mala evolución clínica y con el perfil de genes de IgV_H (Rosenquist et al., 2013).



Figura 2: Ilustración de los marcadores pronósticos genéticos más relevantes relacionados con el perfil mutacional de los genes VH. Esquematizándose diferentes mecanismos moleculares que conducen a la identificación de un paciente con LLC indolente con los genes IgV_H mutados; o de un paciente mal pronosticado con genes IgV_H no mutados (Figura tomada de Rosenquist et al., 2013).

LPL COMO MARCADOR PRONÓSTICO DE LA LLC

El descubrimiento del gen de la LPL surge a partir de ensayos de microarray de la expresión génica entre dos grupos de pacientes con LLC: pacientes con IgV_H MUT y buena progresión; y pacientes con IgV_H NM y mala progresión. De este estudio se obtuvo un conjunto de genes expresados de forma diferencial entre los dos grupos, en particular los genes de la LPL y la desintegrina y metaloproteasa 29 (ADAM29), demostraron ser las moléculas de mayor expresión en el grupo de los IgV_H NM (Vasconcelos et al., 2005). El valor pronóstico de los mismos ha sido evaluado cuantificando su expresión mediante qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) (Kaderi et al., 2011). Opezzo y colaboradores han reportado que la relación entre la expresión de la LPL y de ADAM29, permite una mejor valoración pronóstica temprana, y es de mayor valor pronóstico frente a otros marcadores en etapas avanzadas de la enfermedad (Oppezzo et al., 2005).

La LPL es una enzima que cataliza la hidrólisis de triacilglicéridos (TAG) transportados por quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad, teniendo así un papel clave en el metabolismo, por ser la responsable del destino de los ácidos grasos que servirán tanto para almacenamiento como para suministro energético en los tejidos (Eckel, 1989; Mead et al., 2002 a).

Se ha reportado que en células tumorales, la LPL cumple a su vez funciones no catalíticas, uniéndose simultáneamente tanto a lipoproteína como a proteínas específicas de la superficie celular, incluyendo las cadenas de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG). A través de este mecanismo, la LPL actuaría como puente en la acumulación y la captación celular de lipoproteínas (Mead et al., 2002 b).

Si bien la utilidad que presenta la LPL en el diagnóstico de la LLC es alta, permanecen sin resolver mecanismos fundamentales como el papel funcional de la LPL en el linfocito B y los mecanismos moleculares que regulan su expresión. Sin embargo existen avances en el estudio de dichos mecanismos. Los mismos se basan 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 (Moreno et al., 2013). En este sentido, se ha reportado que cambios en los patrones de metilación de los residuos de citosina específicos del tejido, pueden resultar alterados por factores del ambiente, los cuales se vinculan frecuentemente a desórdenes propios del proceso tumoral (Brenet, et al., 2011; Watanabe et al., 2008).

La LPL cumple una función de puente para la formación de complejos moleculares (lipoproteína-HSPG), lo cual podría relacionarse con la capacidad migratoria del subconjunto de células leucémicas proliferantes. De ser así, la LPL podría actuar de forma similar a un factor de intercambio, facilitando las interacciones con las células circundantes en el microambiente de los distintos tejidos, como por ejemplo células dendríticas foliculares (Moreno et al., 2013).

Asimismo, existen estudios en los que se ha reportado la validez del concepto de que el metabolismo lipídico y la actividad de las lipasas resultarían funcionalmente relevantes para la patogénesis y progresión de la LLC. En estos estudios, se ha reportado que ante el tratamiento de los linfocitos B con un inhibidor de lipasas, la resistencia de éstos a la apoptosis desaparece e incluso se induce la misma, así como también resulta en una respuesta más efectiva a la acción de fármacos (Pallasch et al., 2008).

Basados en el carácter multifásico de los procesos que determinan el balance entre la proliferación y la muerte celular programada y en el hecho de que los mismos ocurren principalmente a nivel subcelular (Ferlay et al., 2012), nos planteamos el objetivo de analizar mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), las alteraciones subcelulares presentes en las células B de pacientes indolentes y pacientes progresores con LLC. Esto nos permitiría comprender mejor el comportamiento complejo de la clona leucémica, así como identificar la presencia de características subcelulares que permitan su empleo como elemento pronósticos tempranos de la progresión tumoral de esta neoplasia linfoide.

Para complementar el objetivo del análisis ultraestructural, se planteo realizar ensayos mediante inmuno-MET, con el fin de determinar localización intracelular de la lipoprotein lipasa (LPL) en las células B. La expresión específica y anormal de LPL podría brindar una estrategia para comprender el comportamiento heterogéneo de esta enfermedad. Además, como no se ha identificado la expresión de LPL en células B normales purificadas, se considera que la LPL es uno de los mejores marcadores de ARN con valor pronóstico, pues permiten predecir la evolución de la LLC con niveles de confiabilidad comparables a los del estudio del perfil mutacional de las cadenas pesadas de inmunoglobulina (IgV_H).

MATERIALES Y MÉTODOS

ELECCIÓN DE LA COHORTE

Las células B empleadas en esta investigación corresponden a muestras de sangre periférica obtenidas de pacientes del Hospital de Clínicas (Facultad de Medicina - UdelaR) y del Hospital Maciel (ASSE, Ministerio de Salud Pública) (Tabla 1).

Pacientes	Linfocitosis	Estadio Binet	Edad	Perfil IgV _H
Indolente 1	162000	В	52	Mutado
Indolente 2	Nd*	Nd*	65	Mutado
Indolente 3	Nd*	А	75	Mutado
Progresor 1	63700	В	79	No mutado
Progresor 2	52300	В	73	No mutado
Progresor 3	900000	Nd*	61	No mutado

Tabla 1. Datos de los pacientes utilizados en esta investigación

*Nd: Sin dato.

Se utilizaron células B obtenidas de dos grupos de pacientes y se analizaron un total de seis muestras provenientes de tres pacientes por cada condición. El primer grupo estuvo compuesto por las células B derivadas de pacientes leucémicos progresores, positivos para el marcador de ARNm LPL. El segundo grupo estuvo compuesto por las células B derivadas de pacientes leucémicos indolentes negativos para el marcador ARNm LPL. En este trabajo las muestras provenientes del segundo grupo, oficiaron como muestras control. Esto permitió determinar con mayor precisión, si existían o no características subcelulares diferenciales entre los pacientes con LLC de ambos grupos, así como comprender mejor el comportamiento complejo del clon leucémico y la heterogeneidad molecular presente en esta enfermedad.

Se analizaron también muestras de donantes sanos como control interno.

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Para aislar las células mononucleares, se centrifugó un volumen de 20 mL de sangre periférica en gradiente de densidad discontinuo. Para ello, se diluyó la sangre al 50% con buffer fosfato salino 0,1 M (PBS). Esta suspensión se sembró en una capa de Ficoll-Hypaque y se centrifugó durante 17 minutos a 400g a 4°C. Finalizada la centrifugación, las células mononucleares quedaron situadas sobre la capa de Ficoll-Hypaque formando un halo (Figura 3). El mismo fue retirado y resuspendido en solución fisiológica para eliminar los restos de Ficoll-Hypaque. Esto se realizó dos veces, centrifugando la suspensión luego de cada lavado, durante 5 minutos a 400g. Finalmente se obtuvo un pellet integrado por la fracción correspondiente a células mononucleadas.



Figura 3. Método utilizado para la obtención de células mononucleadas en sangre periférica. A la izquierda se observa el principio del procedimiento, antes de la centrifugación. A la derecha se muestra el resultado de la centrifugación. B: Sangre al 50 % en PBS. F: Ficoll-Hypaque. P: Plasma. R: Eritrocitos y células multinucleadas. W: Células mononucleadas. (Imagen tomada de http://multiple-sclerosis-research.blogspot.com).

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Técnica de rutina

Para el estudio de la morfología subcelular, el pellet obtenido de cada muestra de sangre, fue resuspendido en una mezcla fijadora compuesta por paraformaldehído (PFA) y glutaraldehído, dos de los líquidos fijadores más utilizados en los estudios con microscopía electrónica de transmisión (MET). El uso combinado de PFA y glutaraldehído, permite la suma de las cualidades de ambos fijadores (mayor velocidad de penetración en los tejidos y mayor estabilidad de la arquitectura subcelular luego de la fijación, respectivamente), obteniéndose mejores resultados. Las células fueron fijadas durante toda la noche a una temperatura de 4°C, en una solución de PFA al 10% y glutaraldehído al 3,5% en PBS, con un pH de 7,2 – 7,4. Cumplido dicho período, se retiró el líquido fijador y se procedió a lavar las células para eliminar los restos de fijador. Se realizaron cinco lavados con PBS, de cinco minutos cada uno. Esto fue seguido por una post-fijación en tetróxido de osmio (OsO₄) preparado al 1% en agua milli-Q filtrada, durante dos horas a temperatura ambiente. Este compuesto se une a las cabezas polares de los lípidos de membrana y, paralelamente, aumenta el contraste de las mismas por depósito de óxidos e hidróxidos de osmio en el sitio de actividad, confiriendo a las estructuras membranosas un intenso color negro (Porter et al., 1953). Posteriormente, se realizaron cinco lavados en agua milli-Q filtrada para eliminar los restos de OsO4, luego de lo cual se procedió a deshidratar paulatinamente las muestras. Para ello se sometieron a pasajes sucesivos por alcoholes de concentración creciente hasta llegar a alcohol absoluto. La deshidratación paulatina se realiza con el propósito de evitar la retracción de las células por extracción brusca de agua. A continuación se hicieron dos pasajes por acetona anhidra pura. La acetona funciona como líquido intermediario por ser miscible tanto con el alcohol etílico como con la resina de inclusión, contribuyendo a eliminar los restos de alcohol de los tejidos a la vez que facilita luego el embebido de la muestra biológica con la resina. Para que las células puedan ser seccionadas en rodajas posibles de ser observadas mediante MET, es necesario incluirlas previamente en un bloque de resina que les confiera

rigidez. Es por ello que previamente se realiza la imbibición de la muestra, sometiendo al pellet de células a baños sucesivos en mezclas de resina-acetona de concentración creciente, hasta llegar a resina pura. En este trabajo las muestras fueron incluidas en bloques de Araldita[®], utilizando cápsula Beem de fondo cónico. La Araldita[®] es una resina epóxica hidrofóbica, que polimeriza a 60°C.

Una vez obtenido el bloque, se talló la región de interés y se realizaron secciones semi y ultrafinas de las muestras, empleando un ultramicrótomo marca RMC, modelo MT-X, equipado con cuchilla de vidrio. La realización de los cortes semifinos (de 0,3 a 0,5 µm de espesor), permitió localizar la zona de interés, es decir, aquella zona con mayor densidad de células. Estos cortes se montaron sobre portaobjetos de vidrio, se tiñeron con azul de metileno boráxico al 1% y se examinaron bajo un microscopio de luz marca Nikon, modelo Eclipse E200. Los cortes ultrafinos (de 40 a 70 nm de espesor) fueron montados en rejillas de cobre con retículo (de 100 a 400 mesh), cubiertas con film de Formvar. El contraste de las células se realizó empleando sales metálicas pesadas que se depositan diferencialmente sobre las distintas estructuras subcelulares posibilitando una mejor visualización al MET. En nuestro caso, la rejilla con los cortes se contrastó por flotación sobre una gota de 25 µL de solución acuosa saturada de acetato de uranilo al 2% (en agua milli-Q filtrada), en cámara húmeda, durante 2 horas, y a 60°C. A continuación, se procedió a lavar el excedente de acetato de uranilo en agua milli-Q filtrada y se realizó un segundo contraste con citrato de plomo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavó el excedente de citrato de plomo de las rejillas con agua milli-Q, se drenó el agua con papel de filtro y se archivaron debidamente identificadas hasta el momento de su observación al MET.

La observación y análisis de las muestra se realizó en un microscopio electrónico de transmisión marca Jeol, modelo JEM 1010, operado a 100 kV. Las imágenes de interés fueron capturadas con una cámara digital HAMAMATSU C4742-95 acoplada al MET. El procesamiento de las mismas se llevó a cabo con el programa Photoimpact 4.2.

Técnica de procesamiento de muestras para inmuno-MET

Dos muestras de cada grupo de pacientes, (homólogas a las procesadas previamente mediante la técnica de rutina para MET), fueron destinadas a los estudios de inmunodetección mediante microscopía electrónica. Para conservar la antigenicidad de la muestra, las células se fijaron únicamente con PFA al 10% en PBS, y permanecieron en dicha solución por 24 hs a 4°C. Al día siguiente, se realizaron cinco lavados de 5 minutos cada uno en agua milli-Q filtrada para retirar los restos del fijador. La deshidratación de las muestras se realizó mediante pasajes sucesivos en alcohol etílico de concentración creciente (25 -50 – 70 %) a temperatura ambiente. En este caso, la inclusión de los pellets celulares debió realizarse en una resina hidrofílica, a fin de permitir el proceso de inmunodetección posterior. Para ello, primero se incubaron las muestras con una mezcla 1:1 de la resina LR-White con etanol absoluto durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron nuevas incubaciones con mezclas de etanol-resina de concentración creciente, hasta llegar a LR-White puro, dónde las muestras quedaron inmersas toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se hizo un nuevo cambio de resina a temperatura ambiente y a las 3 horas se realizaron los bloques. Para ello, se traspasaron las células impregnadas en la resina, a cápsulas de gelatina que se rellenaron con LR-White, cuidando no dejar burbujas de aire en su interior. La polimerización de los bloques se realizó en estufa a 45°C durante 72 horas.

Para la obtención de secciones semi y ultrafinas de las muestras se siguió un procedimiento similar al descripto previamente. A diferencia del caso anterior, la colecta de los cortes ultrafinos se realizó en rejillas de retículo de niquel para evitar la contaminación del material, por oxidación del cobre, en el proceso de incubación en los anticuerpos durante la inmunodetección posterior.

Inmunodetección con partículas de oro coloidal

Esta técnica se empleó como herramienta para detectar la presencia y localización de la proteína LPL en células B con LLC. Todos los procedimientos descritos a continuación se realizaron en una cámara húmeda y a temperatura ambiente.

Primero se hidrataron las secciones ultrafinas por flotación de las rejillas en 20 µL de PBS durante 5 minutos. Luego, se incubaron en solución de bloqueo durante 90 minutos para evitar la unión del anticuerpo primario a zonas inespecíficas de la muestra. Esta solución estaba compuesta por PBS con seroalbúmina bovina (BSA) al 3%, glicina 0,1M y Tritón X-100 0,1% (para la permeabilizar el material biológico). A continuación, parte de las rejilla se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal anti-LPL hecho en ratón (Santa Cruz Biotechnology: 5D2) en una dilución 1:200 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Rejillas homólogas fueron incubadas durante igual tiempo y en las mismas condiciones pero en solución de bloqueo, utilizándose como control negativo. Al día siguiente, se efectuaron cuatro lavados de 10 minutos cada uno en solución de blogueo, de manera de eliminar el anticuerpo primario que no se unió a su antígeno. Luego, se incubaron todas las rejillas en el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón conjugado a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro (Lifetechnologies: A31561) en una dilución de 1:50 en solución de bloqueo, durante toda la noche y a 4°C. A continuación se llevaron a cabo dos lavados de 10 minutos cada uno, en solución de bloqueo para eliminar el anticuerpo secundario que no se ligó al anticuerpo primario, y dos lavados más en agua milli-Q filtrada, previo a realizar el contraste de las muestras con sales metálicas pesadas. Para ello, se colocaron las rejillas en 25 µL con solución saturada de acetato de uranilo al 2% en agua milli-Q filtrada durante 15 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente. Se continuó con los lavados en agua milli-Q y se realizó el segundo contraste con citrato de plomo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente en agua milli-Q; se secaron con papel de filtro y se almacenaron debidamente identificadas hasta su posterior observación al MET.

CUANTIFICACÍON Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si las diferencias observadas entre las células B leucémicas de ambos grupos de pacientes eran significativas, se realizó la cuantificación y el análisis estadístico de las alteraciones subcelulares halladas en ambos grupos. Para ello, se utilizó el programa Fiji (de libre acceso), para la cuantificación, el programa GraphPad Prism 6 para la realización de gráficas y el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney.

Para realizar las cuantificaciones y los análisis de las alteraciones subcelulares se utilizaron 100 células por paciente, excepto cuando se cuantificó el espesor de las cisternas del aparato de Golgi que se utilizaron 50 células por paciente.

El criterio utilizado en la cuantificación se adaptó a las necesidades de cada estructura analizada. Para la medición de los diámetros celular y nuclear, se hicieron seis medidas por célula y luego se calculó el promedio. El número obtenido fue el utilizado para graficar, por lo que cada punto en la gráfica representa una célula. Para analizar la relación núcleo-citoplasma se utilizó la media y el desvío estándar.

Para calcular el espesor de las cisternas perinucleares, del retículo endoplasmático rugoso y del aparato de Golgi, se tomaron diez medidas por organelo y por célula, antes de calcular el promedio. Esto responde al hecho de que dichos organelos presentan variaciones locales de su espesor, y de este modo se minimizó la ocurrencia de errores por el criterio de selección de la región a medir utilizado para cada organelo.

Para estudiar la distribución de las mitocondrias en el citoplasma, se dividió a la

célula en cuatro cuadrantes, como lo muestra la figura. Luego, se contaron las mitocondrias en cada cuadrante y se ordenaron de menor a mayor, de manera tal que el cuadrante I es el que tiene menos número de mitocondrias y el cuadrante IV el que tiene igual o más. De esta forma, si la distribución de las mitocondrias en el citoplasma no era homogénea se haría evidente en un histograma.



RESULTADOS

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS B EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA

Con el fin de conocer en detalle la morfología celular y subcelular de las células B obtenidas de pacientes con LLC, tanto indolentes como progresores, se analizaron las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión.

Los resultados obtenidos permitieron identificar la existencia de características estructurales propias de las células B leucémicas. Las mismas incluyen la presencia de alteraciones subcelulares tanto en la organización celular interna como a nivel de la membrana plasmática.

Morfología celular y nuclear

Las muestras correspondientes a los pacientes leucémicos indolentes, conservan características de las células B no leucémicas. Entre éstas se destacan el perfil circular de las células y de su núcleo (Figura 4 A-B), guardando una proporción núcleo-citoplasma de 0,70 \pm 0,14.

A diferencia de éstas, las células B de pacientes progresores con LLC, mostraron una superficie celular irregular (Figura 4 C-F), determinada por la presencia de múltiples expansiones de la membrana citoplasmática (Figura 4 D-F). El núcleo de estas células puede presentar al corte un perfil lobulado, en herradura ó circular, con uno o más nucléolos, pero siempre ubicado centralmente en el cuerpo celular (Figura 4 C-F). En los núcleos de perfil circular, la heterocromatina puede adoptar una disposición anular asociada a la envoltura nuclear interna (Figura 4 F). La relación núcleo-citoplasma en las células B de los pacientes progresores es de 0,62 \pm 0,13.

En base a estas observaciones se decidió analizar si existían cambios morfométricos significativos, entre las muestras correspondientes a los pacientes con LLC indolentes y entre aquellas provenientes de los pacientes con

Figura 4. Morfología celular y nuclear de células B de pacientes indolentes y progresores con LLC. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión, técnica de rutina. (A - B) Células B de pacientes indolentes que presentan un perfil celular y nuclear de sección circular. (C - F) Células B de pacientes progresores que muestran una superficie celular irregular, (F) determinada por la presencia de múltiples expansiones citoplasmáticas. (C - F) El perfil nuclear de estas células puede presentarse lobulado, en herradura ó circular, con uno o más nucléolos. (F) En los núcleos de perfil circular, la heterocromatina puede adoptar una disposición anular asociada a la envoltura nuclear interna. N: núcleo, Nu: nucléolo. Barras de escala: 1µm.



LLC progresores. Para ello se realizó la cuantificación de las medidas de diámetro celular y nuclear de las células B de ambos grupos de pacientes, lo cual mostró resultados no significativos dentro de cada grupo (Figura 5 A-B). Sin embargo, al analizar las muestras provenientes de ambos grupos de pacientes entre sí con el test de Mann-Whitney, las diferencias en las medianas del diámetro celular resultaron ser significativas, con un p-valor menor a 0,0001 (Figura 5 C). No ocurrió lo mismo con las medidas del diámetro nuclear, ya que no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes con el mismo test (Figura 5 D).

Al cuantificar la presencia de diferentes perfiles nucleares, se encontró que en los pacientes indolentes el 100% de los perfiles nucleares era regular (de tipo circular en Wei et al., 1996). En los pacientes progresores sin embargo, el porcentaje de los perfiles nucleares se distribuyó en regular, lobulado y en herradura, siendo el perfil regular el hallado en mayor proporción (Tabla 2).

	Regular	Lobulado	Herradura
Indolente 1	100%	0%	0%
Indolente 2	100%	0%	0%
Indolente 3	100%	0%	0%
Progresor 1	69%	22%	9%
Progresor 2	71%	16%	13%
Progresor 3	57%	27%	16%

Tabla 2. Perfil nuclear de los pacientes con LLC.

Figura 5. Análisis estadístico de las variaciones observadas en los diámetros celular y nuclear de células B de pacientes indolentes y progresores con LLC. (A) Diámetro celular y (B) nuclear de las células B de los pacientes estudiados. (C) Diámetro celular y (D) nuclear de las células B agrupados en pacientes indolentes o progresores. Con el test estadístico de Mann-Whitney, las diferencias de las medianas del diámetro celular de las células B agrupadas resultaron ser significativas (p< 0,0001 (C)). Sin embargo, las diferencias de las medianas del diámetro nuclear (D), resultaron no significativas con el mismo test. Ø: diámetro. A-B: las barras representan la Media \pm SD, los puntos células individuales. C-D: las cajas representan el rango intercuartil, la línea dentro de la caja indica la mediana, y los bigotes el intervalo 5-95%.





Anatomía microscópica de las cisternas perinuclear, del retículo endoplasmático rugoso y del aparato de Golgi

Las células B de ambos grupos de pacientes con LLC (indolentes y progresores) presentan la cisterna perinuclear dilatada (Figura 6 A-F y Figura 7 A-F), respecto a lo observado en linfocitos B normales (Myers et al., 2014). En todos los pacientes analizados se encontró un rango de variabilidad amplio pero homogéneo en las dimensiones de la dilatación, no encontrándose diferencias significativas entre lo observado para pacientes indolentes (90,11 ± 36,72), ni entre los datos obtenidos para los pacientes progresores (85,43 ± 27,86) (Figura 8 A). El análisis estadístico con el test de Mann-Whitney realizado comparando los datos de los pacientes indolentes con los datos de los pacientes progresores, indicó que las diferencias observadas en la dilatación de la cisterna perinuclear no era significativa (Figura 8 B).

Así mismo se encontró que tanto las células B de los pacientes con LLC progresores como indolentes, presentan dilatadas las cisternas del retículo endoplasmático rugoso (RER) (Figura 9 A-F), respecto a lo reportado en la literatura para las células B normales (Fawcett et al., 1987). Cuando se realizó el análisis estadístico de las medidas de espesor obtenidas de las cisternas del RER, entre pacientes indolentes (91,74 \pm 25,57), y pacientes progresores (95,49 \pm 35,02), así como los resultados obtenidos dentro de cada grupo entre sí, no se hallaron diferencias significativas para ninguno de los casos (Figura 10 A-B).

Sin embargo, al analizar las características morfométricas de las cisternas del aparato de Golgi se encontró que estaban dilatadas las cisternas del mismo en las células B de los pacientes con LLC progresores (Figura 12 A-F), no hallándose esta dilatación en los pacientes indolentes (Figura 11 A-D). Las diferencias de espesor de las cisternas del aparato de Golgi en los pacientes progresores, tienen un rango de variabilidad amplio (142,40 \pm 61,63) pero homogéneo entre distintos pacientes, ya que para cada uno se obtuvo un rango similar. En contraste, la variabilidad entre los pacientes indolentes es más restringida (34,93 \pm 7,53) pero continúa siendo homogénea (Figura 13 A). Al realizar el análisis comparativo entre los datos obtenidos de pacientes

Figura 6. Dilatación de la cisterna perinuclear en células B de pacientes indolentes con LLC. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión, técnica de rutina. (A, C, E) Micrografía panorámica de células B de pacientes indolentes. (B, D, F) Detalle a mayor magnificación de los recuadros en las células A, C, E respectivamente. Puntas de flecha indican la dilatación en la cisterna perinuclear de dichas células. N: núcleo, Nu: nucléolo, RER: Retículo endoplasmático rugoso. Barras de escala: 1µm (A, C, E), 500 nm (B, D, F).



Figura 7. Dilatación de la cisterna perinuclear en células B de pacientes progresores con LLC. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión, técnica de rutina. (A, C, E) Micrografía panorámica de células B de pacientes progresores. (B, D, F) Ampliación de recuadros indicados en las imágenes en la columna de la izquierda. Puntas de flecha indican la dilatación en la cisterna perinuclear. M: Mitocondria, N: núcleo, Nu: nucléolo, RER: Retículo endoplasmático rugoso, V: Vesícula. Barras de escala: 1µm (A, C, E), 500 nm (B, D, F).













Figura 8. Análisis estadístico de la variabilidad en el espesor de la cisterna perinuclear en células B de pacientes indolentes y progresores con LLC. (A) Datos cuantitativos de pacientes individuales donde se observa un rango de variabilidad amplio pero homogéneo dentro de cada grupo: pacientes indolentes (90,11 \pm 36,72) y progresores (85,43 \pm 27,86). La línea punteada roja indica el espesor promedio de la cisterna perinuclear de una célula B normal. (B) Datos agrupados en pacientes indolentes y progresores donde se observa que la diferencia de las medianas en el test estadístico de Mann-Whitney resultó no significativa. A: las barras representan Media \pm SD, los puntos células individuales. B: las cajas representan el rango intercuartil, la línea dentro de la caja indica la mediana, y los bigotes el intervalo 5-95%.





Figura 9. Dilatación de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso en células B de pacientes indolentes y progresores con LLC. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión, técnica de rutina. (A) Micrografía panorámica de célula B de paciente indolente. (B) Ampliación de recuadro indicado en A, en donde se observa la dilatación del retículo endoplasmático rugoso (RER). (C, E) Imágenes panorámicas de células B de pacientes progresores. (D, F) Ampliaciones correspondientes a los recuadros señalados en C y E, donde se observa la dilatación del RER. M: Mitocondria, N: núcleo, Nu: nucléolo, RER: Retículo endoplasmático rugoso. Barras de escala: 1µm (A, C, E), 500 nm (B, D, F).


Figura 10. Análisis estadístico de la variabilidad en el espesor de las cisternas del Retículo endoplasmático rugoso de células B de pacientes indolentes y progresores con LLC. (A) Datos cuantitativos de pacientes donde se observa un rango de variabilidad amplio pero homogéneo entre los pacientes indolentes (91,74 \pm 25,57) y los progresores (95,49 \pm 35,02). La línea punteada roja indica el espesor promedio de la cisterna del RER de una célula B normal. (B) Datos agrupados en pacientes indolentes y progresores donde se observa que la diferencia de las medianas en el test estadístico de Mann-Whitney resultó no significativa. A: las barras representan Media \pm SD, los puntos células individuales. B: las cajas representan el rango intercuartil, la línea dentro de la caja indica la mediana, y los bigotes el intervalo 5-95%.





Figura 11. Las cisternas del aparato de Golgi no presentan alteraciones en células B de pacientes indolentes con LLC. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión, técnica de rutina. **(A, C)** Micrografía panorámica de células B de pacientes indolentes. **(B, D)** Ampliación de recuadros señalados en A y B, donde se señala que las cisternas de aparato de Golgi no presentan alteraciones (G). N: núcleo, Nu: nucléolo, G: Aparato de Golgi. Barras de escala: 1µm (A, C), 500 nm (B, D).



Figura 12. Las cisternas del aparato de Golgi se encuentran dilatadas en células B de pacientes progresores con LLC. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión, técnica de rutina. **(A, C, E)** Micrografía panorámica de células B de pacientes progresores. **(B, D, F)** Ampliación de recuadros indicados en las imágenes en la columna de la izquierda, donde se observa la dilatación de las cisternas del aparato de Golgi (G). C: Centriolo, G: Aparato de Golgi, M: Mitocondria, N: núcleo, Nu: nucléolo. Barras de escala: 1µm (A, C, E), 500 nm (B, D, F).







N

C

G

Figura 13. Análisis estadístico de la variabilidad en el espesor de las cisternas del aparato de Golgi en células B de pacientes indolentes y progresores con LLC. (A) Datos cuantitativos de pacientes individuales, donde se observa que los pacientes progresores presentan un rango de variabilidad más amplio (142,40 \pm 61,63) que los pacientes indolentes (34,93 \pm 7,53). (B) Datos agrupados en pacientes indolentes y progresores donde se observa que la diferencia de las medianas en el test estadístico de Mann Whitney resultó significativa (p< 0,0001). A: las barras representan Media \pm SD, los puntos células individuales. B: las cajas representan el rango intercuartil, la línea dentro de la caja indica la mediana, y los bigotes el intervalo 5-95%.





indolentes y los registrados para los progresores, se observó que la diferencia en la dilatación de las cisternas del aparato de Golgi es estadísticamente significativa, con un p valor de 0,0001 con el test de Mann-Whitney (Figura 13 B).

Tamaño y distribución de las mitocondrias

Cuando se compararon los tamaños de las mitocondrias de pacientes con LLC indolentes y progresores, se encontró que ambos presentaban dimensiones variables de este organelo (Figura 14 A-F y Figura 15 A-F). Así mismo se observó que en los pacientes con LLC progresores, las mitocondrias parecían situarse agrupadas preferentemente en un sector del citoplasma (Figura 15 A-F). Para cuantificar dicha observación cualitativa, se realizó una medición de la frecuencia con que aparecía esta característica, y se encontró que en los pacientes progresores las mitocondrias de las células B se ubicaban generalmente hacia uno o dos cuadrantes del citoplasma (Figura 16).

Presencia de centríolos y vesículas

Tanto en las células B leucémicas de pacientes progresores como de indolentes, se constató la presencia de centríolos (Figura 17 A-F). También se observaron numerosas vesículas de distintos tamaños, que pueden contener gránulos electrón-densos en el citoplasma de estas células en ambos grupos de pacientes (Figura 18 A-F).

Figura 14. Las mitocondrias se distribuyen homogéneamente en el citoplasma de células B en pacientes indolentes con LLC. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión, técnica de rutina. (A, C, E) Micrografía panorámica de células B de pacientes indolentes, en donde se observa que las mitocondrias se distribuyen de forma homogénea en el citoplasma de dichas células. (B, D, F) Ampliaciones correspondientes a los recuadros señalados en A, C y E, donde se observa la ultraestructura de las mitocondrias. M: Mitocondria, N: núcleo, Nu: nucléolo. Barras de escala: 1µm (A, C, E), 500 nm (B, D, F).



Figura 15. Las mitocondrias se encuentran agrupadas preferentemente en un sector del citoplasma en células B de pacientes progresores con LLC. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión, técnica de rutina. (A, C, E) Micrografía panorámica de células B de pacientes progresores, en donde se visualiza a las mitocondrias agrupadas en un sector del citoplasma. (B, D, F) Ampliaciones correspondientes a los recuadros señalados en A, C y E, donde se observa la ultraestructura de las mitocondrias. M: Mitocondria, N: núcleo, Nu: nucléolo. Barras de escala: 1µm (A, C, E), 500 nm (B, D, F).













Figura 16. Cuantificación de las mitocondrias en las células B de pacientes indolentes y progresores con LLC, y su distribución en el citoplasma. Se observa que en las células B de los pacientes indolentes las mitocondrias se distribuyen homogéneamente entre los cuadrantes del citoplasma. En los pacientes progresores hay una distribución heterogénea de las mitocondrias, las cuales se disponen preferentemente hacia uno o dos cuadrantes del citoplasma. C: Cuadrante.



Figura 17. Presencia de centríolos en células B de pacientes indolentes y progresores con LLC. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión, técnica de rutina. (A) Micrografía panorámica de célula B de paciente indolente. (B) Ampliación de recuadro indicado en A, donde se observa la ultraestructura del centriolo. (C, E) Imágenes panorámicas de células B de pacientes progresores. (D, F) Ampliaciones correspondientes a los recuadros señalados en C y E, donde se visualiza la ultraestructura de los centríolos. C: Centríolos, M: Mitocondria, N: núcleo, Nu: nucléolo. Barras de escala: 1µm (A, C, E), 500 nm (B, D, F).











Figura 18. Presencia de vesículas en células B de pacientes indolentes y progresores con LLC. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión, técnica de rutina. (A) Micrografía panorámica de célula B de paciente indolente. (B) Ampliación de recuadro indicado en A, donde se observa la ultraestructura de las vesículas. (C, E) Imágenes panorámicas de células B de pacientes progresores. (D, F) Ampliaciones correspondientes a los recuadros señalados en C y E, donde se visualiza la ultraestructura de las vesículas. M: Mitocondria, N: núcleo, Nu: nucléolo, V: Vesículas. Barras de escala: 1µm (A, C, E), 500 nm (B, D, F).



PRIMER ACERCAMIENTO A LA LOCALIZACIÓN DE LA LIPOPROTEIN LIPASA

Para complementar los resultados obtenidos por microscopía electrónica de transmisión, se decidió iniciar ensayos que pudieran acercarnos a determinar con mayor precisión cuál es la localización de la proteína LPL a nivel subcelular. La concordancia de los resultados podría permitir proponerlos como elementos pronósticos tempranos de la progresión tumoral. Con este propósito se procesaron muestras homólogas a las anteriormente analizadas, siguiendo el protocolo de procesamiento para inmunodetección de la LPL con oro coloidal de 10 nm mediante MET.

La señal para LPL se detectó en la superficie de las células B, tanto en pacientes con LLC progresores (Figura 19 C-D) como en los pacientes con LLC indolentes (Figura 19 A-B).

Sin embargo, se observó que en pacientes con LLC progresores la LPL se encuentra también en el interior de las células B tumorales, principalmente retenida en cisternas como las del RER (Figura 20 A-D) y formando pequeños aglomerados en el citoplasma (Figura 20 E-F).

En el control negativo de la técnica de inmunodetección no se observaron partículas de oro coloidal (Figura 21 B).

Figura 19. La lipoprotein lipasa se localiza en la superficie celular de células B en pacientes con LLC. Imágenes de inmuno-microscopía electrónica con oro coloidal. (A) Micrografía panorámica de célula B de paciente indolente. (B) Ampliación de recuadro indicado en A, en donde se detecta la presencia de la lipoprotein lipasa (LPL) en la superficie celular (puntas de flecha blanca) (C) Imagen panorámica de célula B de paciente progresor. (D) Ampliación correspondiente al recuadro señalado en C, donde se visualiza a la LPL en la superficie celular (puntas de flecha negra indica señal inespecífica. N: Núcleo. Barras de escala: 1µm (A, C), 500 nm (B, D).



Figura 20. La lipoprotein lipasa se localiza retenida en el retículo endoplasmático rugoso y dispuesta en pequeños aglomerados en el citoplasma de células B en un paciente progresor. Imágenes de inmunomicroscopía electrónica con oro coloidal. (A, C, E) Micrografía panorámica de células B de pacientes progresores. (B, D) Ampliaciones de recuadros indicados en A y C, donde se visualiza a la LPL retenida en las cisternas del Retículo endoplasmático rugoso (RER) (puntas de flecha blanca). (F) Ampliación de recuadro indicado en E, donde la LPL se observa conformando pequeños aglomerados en el citoplasma (puntas de flecha blanca). N: núcleo, Nu: nucléolo, RER: Retículo endoplasmático rugoso. Barras de escala: 1µm (A, C, E), 500 nm (B, D, F).



Figura 21. Control negativo de la técnica de inmunodetección mediante microscopia electrónica. (A) Micrografía panorámica de una célula B con LLC. **(B)** Ampliación de recuadro indicado en A, en donde no se observa la presencia la LPL. M: Mitocondria, N: núcleo, Nu: nucléolo, RER: Retículo endoplasmático rugoso. Barras de escala: 1μm (A), 500 nm (B).



DISCUSIÓN

El análisis de las células B leucémicas realizado mediante MET, reveló que las mismas exhiben características ultraestructurales propias, las cuales incluyen alteraciones subcelulares tanto en la organización celular interna como a nivel de la membrana plasmática.

Nuestros resultados parecen indicar que si bien los linfocitos de ambos grupos (indolentes y progresores) comparten algunos aspectos de su estructura celular, los correspondientes al grupo de pacientes progresores exhiben características distintivas. Por tal motivo contrastaremos aquí nuestros resultados con los reportados previamente por otros grupos de investigadores, intentando determinar cuáles de dichas características podrían ser de ayuda a la hora de realizar la caracterización y el diagnóstico de la LLC.

Cuando se analizó el aspecto morfológico externo de las células B de pacientes progresores, la existencia de una superficie celular irregular, determinada por la presencia de múltiples expansiones de la membrana citoplasmática, fue evidente, mostrando diferencias significativas con lo observado en las células B de pacientes con LLC indolentes y dadores sanos. Estas características concuerdan con lo reportado por Hirose y colaboradores (1993), quienes las identifican como estructuras similares a filopodios, y también con las invaginaciones de la membrana plasmática descriptas por Brajuskovic y colaboradores (2004). La obtención de valores estadísticamente significativos en el cálculo del diámetro celular, podría responder a que las células B de los pacientes progresores poseen expansiones de su membrana plasmática, ocasionando así el aumento en el diámetro celular total.

Asimismo encontramos que la forma nuclear de las células B es heterogénea, observándose perfiles nucleares lobulados, en herradura y circulares. Dentro, es posible visualizar uno o más nucléolos. Lo observado por nosotros se correlaciona con lo reportado en estudios previos, donde se describen alteraciones en la regularidad del perfil nuclear de las células B de pacientes con LLC, dónde algunos núcleos adoptan perfiles lobulados e indentados, mientras que el resto presenta un perfil circular (Wei et al., 1996). Sin embargo el mencionado estudio, enfocó su atención en las diferencias presentes entre los linfocitos de pacientes con LLC y los de otros tipos leucemias, utilizando como control células B normales provenientes de dadores sanos. Por lo tanto, nuestro abordaje podría arrojar datos novedosos al contrastar lo hallado en pacientes con LLC indolentes (dónde únicamente se observan perfiles nucleares circulares), respecto de lo observado en los progresores (perfiles lobulados, en herradura y circulares).

En los núcleos de perfil circular, la disposición anular que adopta en algunos casos la heterocromatina, asociándose a la envoltura nuclear interna, podría corresponderse con células que se encuentran en la primera etapa de la apoptosis (Baou et al., 2010), por lo que quizá ésta no sea una característica adicional de las células de LLC. La presencia de células B con esta característica, también podría relacionarse con que, contrariamente a lo que ocurre *in vivo*, las células B de pacientes con LLC, mueren rápidamente por apoptosis cuando se encuentran *in vitro* y en ausencia de células accesorias. Por consiguiente el microambiente celular juega un papel esencial en la sobrevida de las células B de estos pacientes (Caligaris-Cappio, 2003).

Las diferencias en el diámetro nuclear, a pesar de existir, no resultaron significativas entre ambos grupos de pacientes, quizás debido a que el porcentaje de células con el núcleo regular era bastante mayor respecto del resto de los perfiles observados.

Las células B de los pacientes progresores, también mostraron diferencias a nivel mitocondrial. Además de presentar dimensiones variables, las mitocondrias se localizan preferentemente en un sector del citoplasma. La cuantificación comparativa entre pacientes indolentes y progresores muestra que sólo en los pacientes progresores hay una tendencia de las mitocondrias hacia uno o dos cuadrantes del citoplasma. Un comportamiento similar, fue reportado previamente por Wei y colaboradores (1996), quienes describen que en ocasiones las mitocondrias de los pacientes con LLC se reúnen en un sector del citoplasma. Desconocemos la relevancia funcional de esta disposición preferencial de las mitocondrias en las células B de pacientes con LLC, pero podría estar relacionada con una heterogeneidad en los niveles de alteración de la polaridad celular planar (PCP) que han sido descritos para las células de la LLC (Wilkinson et al., 1988; Kaucká et al., 2013). Según Kauká y colaboradores (2013), la PCP, en la LLC, actúa como un regulador importante de la migración celular y de la interacción de las células B con su microambiente, lo que podría explicar la ubicación preferencial de este organelo en determinado sector del citoplasma.

Otra característica propia de los linfocitos B de pacientes progresores es el ancho de la luz de las cisternas del aparato de Golgi, las cuales se encuentran significativamente dilatadas respecto de las células provenientes de pacientes indolentes. Todas las muestras de células B correspondientes a pacientes progresores comparten este aspecto del aparato de Golgi. Este aumento en el espesor de las cisternas, podría deberse a la retención de proteínas en su interior, ya sea debido a deficiencias en el plegamiento de las proteínas (Fawcett et al., 1987), o a alteraciones en el proceso de maduración de la N-glicosilación (Krysov et al, 2010).

Además de las alteraciones descriptas hasta ahora, las células B de pacientes indolentes y progresores comparten entre sí características ultaestructurales, que a su vez las diferencian de aquellas provenientes de dadores sanos. Un ejemplo de ello es la dilatación observada a nivel de las cisternas perinuclear y del retículo endoplasmático rugoso. El aumento en el espesor de la cisternas del RER también ha sido reportado previamente (Brajuskovic et al., 2004) y, al igual que la dilatación de las cisternas del aparato de Golgi, puede estar ocasionado por la retención de proteína con deficiencias en el plegamiento y/o en la oligomerización (Buscà R. et al., 1995; Krysov et al, 2010).

Otro aspecto compartido es la presencia de centríolos, lo que concuerda con lo reportado por Dighiero y colaboradores (2011). Sin embargo, otros investigadores describen no observar con frecuencia estos organelos (Resnitzky et al., 1996). Tal como fue mencionado, la LLC se caracteriza por un aumento en el número de células B en sangre periférica. Dicho incremento en el número de

células sería resultado de un complejo equilibrio entre la activación de la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis. (Dighiero, 2008; Bianchi, 2012). Dada la elevada actividad proliferativa de las células B en esta patología (5000 linfocitos/µL de sangre de acuerdo a Dighiero y colaboradores 2011), es de esperar que la observación de centríolos en el citoplasma sea un hallazgo frecuente (Fırat-Karalar et al., 2014).

Finalmente se identificaron estructuras membranosas de distintas dimensiones en el citoplasma de ambos grupos de pacientes. Algunas de estas estructuras presentan en su interior partículas electrón-densas. Dadas sus características, es posible que se trate de vesículas fagosómicas, puesto que se observan incluídas en un espacio electrón-lúcido rodeado de membrana, tal como ha sido descripto previamente para dichas estructuras (Zhanga et al., 2015).

Para complementar y reforzar los resultados obtenidos mediante MET, y determinar con mayor precisión la localización intracelular de la lipoprotein lipasa (LPL) en las células B, se realizaron ensayos preliminares mediante la técnica de inmunolocalización con partículas de oro coloidal, para microscopía electrónica. A pesar de no conocerse aún, las razones por las que hay una expresión elevada de LPL en pacientes progresores, en los últimos años se ha demostrado que la sobreexpresión de LPL constituye un buen marcador pronóstico debido a su correlación con una mala evolución clínica de estos pacientes y con el perfil de genes de IgV_H (Rosenquist et al., 2013).

Los resultados presentados aquí, sugieren que en los dos pacientes con LLC analizados mediante inmuno-MET (un indolente y un progresor), la LPL está presente en la superficie de las células B. Sin embargo, al analizar la muestra correspondiente al paciente progresor, se observa que la proteína LPL aparece principalmente localizada en el interior de las cisternas del RER, aunque también se la encontró retenida en pequeños aglomerados en el citoplasma. Buscà y colaboradores (1995), demostraron que la actividad catalítica de la LPL necesita de modificaciones post-traduccionales, entre ellas, la N-glicosilación, y que si la misma no ocurre, la LPL queda retenida en las cisternas de RER o del aparato de Golgi; dependiendo del nivel de maduración y del plegamiento de la proteína. Además observaron que la LPL no glicosilada, o glicosilada de forma incompleta, podía ocasionar la acumulación de otras proteínas no relacionadas con la glicosilación en dichas cisternas. Un ejemplo de ello sería la formación de complejos entre proteínas de unión de cadena pesada (BIP) y la LPL en el interior de las cisternas del RER (Buscà et al., 1995). Debido a esto la LPL no glicosilada podría ser una de las razones del cambio morfológico observado en el RER. Estas observaciones junto a los cambios morfológicos observados a nivel del aparato de Golgi parecen indicar la existencia de modificaciones funcionales en células B. Sin embargo, permanecen sin resolver pilares fundamentales relacionados con los mecanismos moleculares que regulan la expresión de esta proteína y también el papel funcional de la misma en las células B de pacientes con LLC y dadores sanos.

CONCLUSIÓN

Los análisis mediante microscopía electrónica de transmisión, revelan la existencia de características ultraestructurales propias de las células B leucémicas. Los mismos parecen indicar que si bien los linfocitos de ambos grupos comparten algunos aspectos de su estructura celular, los correspondientes al grupo de pacientes progresores exhiben características distintivas. Estas incluyen alteraciones subcelulares tanto en la organización celular interna como a nivel de la membrana plasmática, como la expresión elevada y la localización intracelular de la LPL.

Nuestros resultados sugieren que el análisis ultraestructural puede contribuir al diagnóstico y a la caracterización adicional de las células B de pacientes con leucemia linfoide crónica, permitiendo comprender mejor el comportamiento complejo y heterogéneo de la clona leucémica. La identificación sistemática de alteraciones características de la LLC en la estructura sub-celular, junto a la detección de LPL a nivel intracelular, permitirían proponer su empleo como elementos pronósticos tempranos de la progresión tumoral de esta neoplasia linfoide.

BIBLIOGRAFÍA

- Baou, M.; Kohlhaas, S.; Butterworth, M.; Vogler, M.; Dinsdale, D.; Walewska, R.; Majid, A.; Eldering, E.; Dyer, M.; Cohen, G. (2010) Role of NOXA and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. Haematologica. 95 (9): 1510-1518.
- Bezares, F.; Slavutsky, I.; Gabus, R.; Giordano, M.; Oppezzo, P. (2009) Leucemia Linfática Crónica. Las neoplasias linfoides. Buenos Aires, 27–48.
- Bianchi, S.; Dighiero, G.; Pritsch, O. (2012) Selected Topics in Chronic Lymphocytic Leukemia Pathogenesis. En Oppezzo, P. (ed) Chronic Lymphocytic Leukemia, InTech, Open Access Publisher.
- Binet, J.; Leporrier, M.; Dighiero, G.; Charron, D.; Vaugier, G.; Beral, H.; Natali, J.; Raphael, M.; Nizet, B.; Follezou, J. (1977) A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. Prognostic significance. Cancer, 40 (2): 855–864.
- Bosch, F.; Villamor, N. (2003) ZAP-70 expression in CLL: a new parameter for an old disease. Haematologica. 88 (7): 724–726.
- Brajuskovic, G.; Skaro-Milic, A.; Marjanovic, S.; Cerovic, S.; Knezevic, S. (2004) The ultrastructural investigation of mitochondria in B-CLL cells during apoptosis. Arch Oncol. 12 (3): 139-141.
- Brenet, F.; Moh, M.; Funk, P.; Feierstein, E.; Viale, A.; Socci, N.; Scandura, J. (2011) DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. PLoS One. 6 (1): 14524.
- Burger, J.; Ghia, P.; Rosenwald, A.; Caligaris-Cappio, F. (2009) The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. Blood. 114 (16): 3367-3375.
- Buscà, R.; Pujana, M.; Pognonec, P.; Auwerx, J.; Deeb, S.; Reina, M.; Vila, S. (1995) Absence of N-glycosylation at asparagine 43 in human lipoprotein

lipase induces its accumulation in the rough endoplasmic reticulum and alters this cellular compartment. Journal of Lipid Research. 36: 939-951.

- Caligaris-Cappio, F. (2003) Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 123 (3): 380-388.
- Chiorazzi, N. (2007) Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. Best Pract. Res. Clin. Haematol. 20 (3): 399–413.
- Cimmino, A.; Calin, G.; Fabbri, M.; Iorio, M.; Ferracin, M.; Shimizu, M.; Wojcik, S.; Aqeilan, R.; Zupo, S.; Dono, M.; Rassenti, L.; Alder, H.; Volinia, S.; Liu, C.; Kipps, T.; Negrini, M.; Croce, C.(2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci USA. 102 (39): 13944-13949.
- Cuttner, J. (1992) Increased incidence of hematologic malignancies in firstdegree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia Cancer Invest. 10 (2): 103–109.
- Damle, R.; Wasil, T.; Fais, F.; Ghiotto, F.; Valetto, A.; Allen, S.; Buchbinder, A.; Budman, D.; Dittmar, K.; Kolitz, J.; Lichtman, S.; Schulman, P.; Vinciguerra, V.; Rai, K.; Ferrarini, M.; Chiorazzi, N. (1999) Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 94 (6): 1840-1847.
- Dighiero, G. (2003) Unsolved issues in CLL biology and management. Leukemia 17(12): 2385-2391.
- Dighiero, G.; Hamblin, T. (2008) Chronic lymphocytic leukaemia. Lancet. 371 (9617): 1017-1029.
- Dighiero, G.; Karsenti, E.; Follezou, J.; Bornens, M. (1978) Visualization of tubulin in lymphocytes. I. Comparison of normal and Blood. 51 (6): 1031.
- Eckel, R.H. (1989) Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. The New England J. of Medicine. 320: 1060-1068.

- Fawcett, D. (1987) Tratado de histología. Interamericana. McGraw-Hill. 11 ed. Madrid, España.
- Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Ervik, M.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. (2012) Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC GLOBOCAN. CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2010: 29.
- Fırat-Karalar, E.; Stearns, T. (2014). The centriole duplication cycle. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 369 (1650): 20130460.
- Ginaldi, L.; De Martinis, M.; Matutes, E.; Farahat, N.; Morilla, R.; Catovsky, D. (1998) Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. J Clin Pathol. 51: 364-369.
- Hamblin, T. (2007) Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. Best Pract. Res. Clin. Haematol. 20 (3): 455–68.
- Hamblin, T. (2007) Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol. 20 (3): 455-468.
- Hamblin, T.; Davis, Z.; Gardiner, A.; Oscier, D.; Stevenson, F. (1999) Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 94 (6): 1848-1854.
- Hirose, Y.; Konda, S.; Tachibana, J.; Yoshioka, R.; Shimizu, S.; Takiguchi, T. (1993) Electron Microscopic Morphometry of Chronic Type Lymphoid Leukemias. Med. Electron Microsc. 26 (1): 29-39.
- Kaderi, M.; Kanduri, M.; Buhl, A.; Sevov, M.; Cahill, N.; Gunnarsson, R.; Jansson, M.; Smedby, K.; Hjalgrim, H.; Jurlander J.; Juliusson, G.; Mansouri, L.; Rosenquist, R. (2011) LPL is the strongest prognostic factor in a comparative analysis of RNA-based markers in early chronic lymphocytic leukemia. Haematologica. 96 (8): 1153-1160.
- Kaucká, M.; Plevová, K.; Pavlová, Š.; Janovská, P.; Mishra, A.; Verner, J.; Bryja, V. (2013) The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration. Cancer research. 73 (5): 1491-1501.
- Krysov, S.; Potter, K.; Mockridge, C.; Coelho, V.; Wheatley, I.; Packham, G.; Stevenson, F. (2010) Surface IgM of CLL cells displays unusual glycans indicative of engagement of antigen in vivo. Blood. 115 (21): 4198-4205.
- Mead, J.; Irvine, S.; Ramji, D. (2002 a) Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. J Mol Med. 80: 753–769.
- Mead, J.; Ramji, D. (2002 b) The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis. Cardiovasc Res 55: 261–269.
- Miller, A.; Smith, L. (1973) Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein glutamic acid. Formation of a stable surface film. J Biol Chem. 248: 3359-3362.
- Moreno, C.; Montserrat, E. (2008) New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. Blood Rev. 22 (4): 211-219.
- Moreno, P.; Abreu, C.; Borge, M.; Palacios, F.; Morande, P.; Pegazzano, M.; Bianchi, S.; Landoni, A.; Agrelo, R.; Giordano, M.; Dighiero, G.; Gamberale, R.; Oppezzo, P. (2013) Lipoprotein lipase expression in unmutated CLL patients is the consequence of a demethylation process induced by the microenvironment. Leukemia. 27 (3): 721–725.
- Myers, S.; Malladi, C.; Hyland, R.; Bautista, T.; Boadle, R.; Robinson, P.; Garth A.; Nicholson, G. (2014) Mutations in the sptlc1 protein cause mitochondrial structural abnormalities and endoplasmic reticulum stress in lymphoblasts DNA and cell biology. 33 (7): 399–407.
- Oppezzo, P.; Vasconcelos, Y.; Settegrana, C.; Jeannel, D.; Vuillier, F.; Merle-Béral, H.; Yamamoto, M.; Dighiero, G.; Magali, F.; Yuriko, E.; Bechet, S.; Dumas,

G; Brissard, M. (2005) The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator inchronic lymphocytic leukemia. Prepublished online. 106: 650-657.

- Pallasch, C.; Schwamb, J.; Königs, S.; Schulz, A.; Debey, S.; Kofler, D.; Schultze, J.; Hallek, M.; Ultsch, A.; Wendtner, C. (2008) Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. Leukemia. 22 (3): 585–592.
- Porter, K.; Kallman, F. (1953) The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. Experimental Cell Research. 4 (1): 127-141.
- Porter, K.; Kallman, F. (1953) The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. Experimental Cell Research. 4 (1): 127-141.
- Prieto, A.; Barbarroja, J.; Barcenilla, H.; Díaz, D. (2013 a) B lymphocyte functions. Issue 11 (28): 1752-1759.
- Prieto, A.; Barbarroja, J.; García, C.; Monserrat, J. (2013 b) B lymphocytes. Issue 11 (28): 1710-1719.
- Rai, K.; Han, T. (1990) Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 4 (2): 447–56.
- Rawstron, A.; Green, M.; Kuzmicki, A.; Kennedy, B.; Fenton, J.; Evans, P.; O'Connor, S.; Richards, S.; Morgan, G.; Jack, A.; Hillmen, P. (2002) Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of 'indolent' chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. Blood. 100 (2): 635–9.
- Rawstron, A.; Yuille, M.; Fuller, J.; Cullen, M.; Kennedy, B.; Richards, S. (2002) Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal Blymphocyte expansion. Blood. 100: 2289–90.

- Resnitzky, P.; Matutes, E.; Hedges, M.; Morilla, R.; Brito-Babapulle, V.; Khokhar, T.; Catovsky, D. (1996). The ultrastructure of mantle cell lymphoma and other B-cell disorders with translocation t (11; 14) (q13; q32). British journal of haematology. 94 (2): 352-361.
- Rosenquist, R.; Cortese, D.; Bhoi, S.; Mansouri, L.; Gunnarsson, R. (2013) Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? Leuk Lymphoma. 54 (11): 2351-2364.
- Ruben, J.; Ancker, W.; Bontkes, H.; Westers, T.; Hooijberg, E.; Ossenkoppele, G.; Gruijl, T.; Loosdrecht, A. (2014) Apoptotic blebs from leukemic cells as a preferred source of tumor-associated antigen for dendritic cell-based vaccines. Cancer Immunol Immunother. 63: 335–345.
- Schroeder, H.; Dighiero, G. (1994) The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. Immunol. 15 (6): 288-294.
- Sellick, G.; Catovsky, D.; Houston, R. (2006) Familial chronic lymphocytic leukemia. Semin Oncol. 33 (2): 195-201.
- Tamura, K.; Sawada, H.; Izumi, Y.; Fukuda, T.; Utsunomiya, A.; Ikeda, S.; Uije, N.; Tsukada, J.; Kawano, F.; Shibuya, T.; Gondo, H.; Okamura, S.; Suzumiya, J. (2001) Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is rare, but the proportion of T-CLL is high in Japan. Eur J Haematol. 64 (3): 152-157.
- Vasconcelos, Y.; Davi, F.; Levy, V.; Oppezzo, P.; Magnac, C.; Michel, A.; Dighiero, G. (2003) Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.Journal of Clinical Oncology. 21 (21): 3928 - 3932.
- Vasconcelos, Y.; De Vos, J.; Vallat, L.; Reme T.; Lalanne, A.; Wanherdrick, K.; Michel A.; Nguyen-Khac, F.; Oppezzo, P.; Magnac, C.; Maloum K.; Ajchenbaum-Cymbalista, F.; Troussard, X.; Leporrier M.; Klein, B.; Dighiero, G.; Davi, F. (2005) 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. 19 (11): 2002-2005.

- Vrhovac, R.; Delmer, A.; Tang, R.; Marie, J.; Zittoun, R.; Ajchenbaum-Cymbalista, F. (1998) Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. Blood. 91: 4694–4700.
- Wang, Y.; Fan, L.; Wang, L.; Zhang, R.; Zou, Z.; Fang, C.; Zhang, L.; Li, J.; Xu, W. (2013) Expression levels of Lyn, Syk, PLCgamma2 and ERK in patients with chronic lymphocytic leukemia, and higher levels of Lyn are associated with a shorter treatment-free survival. Leuk Lymphoma. 54 (6): 1165-1170.
- Watanabe, M.; Ogawa, Y.; Itoh, K.; Koiwa, T.; Kadin, M.; Watanabe, T.; Okayasu,
 I.; Higashihara, M.; Horie, R. (2008) Hypomethylation of CD30 CpG islands
 with aberrant JunB expression drives CD30 induction in Hodgkin lymphoma
 and anaplastic large cell lymphoma. Lab. Invest. 88 (1): 48–57.
- Wei, G.; Qiaohua, Z.; Yuping, Z.; Jianxia, H.; Wang Lieyang, W. (1996) The ultrastructural study of non-hodgkin's lymphoma cell, chronic lymphocytic and hairy cell leukemia. Chinese Journal of cancer Research. 8: 140 – 143.
- Wilkinson, P.; Islam, L.; Sinclair, D.; Dagg, J. (1988) The defect of lymphocyte locomotion in chronic lymphocytic leukaemia: studies of polarization and growth-dependent locomotion. Clinical and experimental immunology. 71 (3): 497.
- Zhanga, M.; Zhua, Q.; Shia, M.; Liua, Y.; Maa, L.; Yanga, Y.; Fenga, D.; Daia, W.; Zhanga, L.; Kanga, T.; Chena, P.; Hea, Y.; Liua, T.; Zhaoa, Q.; Wanga, W.; Zhia, J.; Fenga, G.; Zhao, G. (2015) Active phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) by Tlymphocytes (Jurkat cells). Molecular Immunology. 66: 429–438.