



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PAPEL DE P53, ZAP-70 Y β 2- MICROGLOBULINA COMO
FACTORES PRONÓSTICO EN LA LEUCEMIA LINFOCÍTICA
CRÓNICA.**

***QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN HEMATOPATOLOGÍA***

PRESENTA

Q.F.B. MAURICIO ORTIZ RAMÍREZ

ASESORA:

DRA. LAURA ARCELIA MONTIEL CERVANTES

ÍNDICE

ABREVIATURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
OBJETIVO	1
JUSTIFICACIÓN	1
INTRODUCCIÓN	2
HISTORIA	2
EPIDEMIOLOGÍA	3
ETIOLOGÍA	3
MANIFESTACIONES CLÍNICAS	7
COMPLICACIONES	8
PRUEBAS DE LABORATORIO	9
DIAGNÓSTICO	11
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	12
FACTORES PRONÓSTICO	15
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFIA	38

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
ác	Ácido
Ag	Antígeno
ATM	Gen de Ataxia Telangiectasia Mutado
BCR	Receptor de células B
CDK	Cinasa Dependiente de Ciclina
CMV	Citomegalovirus
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FISH	Hibridación <i>in situ</i> por fluorescencia
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
IFN	Interferón
IgV _H	Cadenas pesadas de la región variable de las inmunoglobulina
IL	Interleucina
ITAM	Motivo de Activación Intracitoplásmica
IWCLL	International Workshop on CLL
KDa	Kilo Daltones
LAT	Ligando de células T activadas
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLC	Leucemia linfocítica crónica
LPL	Leucemia prolinfocítica
LT	Linfocito T
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NK	Natural killer
PTK	Protein Kinasa de Tirosina
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensajero
SH	Src Homology
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
Smlg	Inmunoglobulina de superficie
TCR	Receptor de Linfocitos T
TNF	Factor de necrosis tumoral
TP53	Gen p53
VEB	Virus de Epstein-Barr
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
β2-m	Beta2- microglobulina

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla no 1. Correlación entre las anomalías citogenéticas y las características clínicoevolutivas.	4
Tabla No 2. Exploración al diagnóstico.	12
Tabla No 3. Inmunofenotipo de Leucemias/Linfomas de cels. B.	13
Tabla No 4. Estadios de Rai.	15
Tabla No 5. Estadios de Binet.	16
Tabla No 6. Factores pronósticos en la Leucemia Linfocítica Crónica.	16
Tabla No 7. Correlación entre el estado mutacional de los genes de IgVH y la expresión de ZAP-70 en la LLC.	35
Tabla No 8. Pronóstico y expresión de ZAP-70 en la LLC.	35

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura No 1. Diagnóstico Diferencial basado en el inmunofenotipo.	13
Figura No 2. Curva de supervivencia de pacientes con LLC, con genes IgV _H mutados y no mutados.	18
Figura No 3. Estructura de una molécula del MHC de clase I determinada por cristalografía radiográfica.	19
Figura No 4. Las moléculas del MHC de clase I no abandonan el retículo endoplásmico a menos que se unan a péptidos.	20
Figura No 5. Estructura cristalina de p53	23
Figura No 6. Un asa de realimentación regulatoria negativa controla los niveles celulares de p53.	24
Figura No 7. Porcentaje de pacientes con p53 positivo (barra negra) y p53 negativo (barra blanca) subdivididos de acuerdo a la fase de la enfermedad.	25
Figura No 8. Porcentaje de pacientes con p53 positivo (barra negra) y pacientes p53 negativo (barra blanca) subdivididos de acuerdo al estado clínico.	25
Figura No 9. Efecto de mutaciones sobre el gen p53 en el papel de éste en procesos relacionados al cáncer.	26
Figura No 10. Histograma de mutaciones más comunes en p53.	27
Figura No 11. Estructura de ZAP-70.	30
Figura No 12. El complejo del receptor de células T está formado por proteínas de reconocimiento de antígenos y proteínas de señalización invariables.	31
Figura No 13. Participación de ZAP-70 en señalización de TCR.	32
Figura No 14. El complejo del receptor de células B (BCR).	35
Figura No 15. Correlación entre el nivel de expresión de ZAP-70 y el estado mutacional de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgV _H).	42

RESUMEN

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una enfermedad caracterizada por la proliferación y acumulación de linfocitos inmunoincompetentes de pequeño tamaño, aspecto maduro y fenotipo B. Ésta enfermedad es la más frecuente en los países occidentales, donde se presenta en individuos de edad adulta y cuya incidencia aumenta con la edad. El curso clínico es altamente variable; la vida media de supervivencia es de aproximadamente 10 años, pero hay pacientes que fallecen al poco tiempo de ser diagnosticados.

La causa de la LLC no se conoce, aunque se han encontrado alteraciones cromosómicas y la participación de otros factores como posibles agentes causales de la enfermedad como los ambientales (radiaciones), biológicos (virus), químicos (solventes) pero no se ha comprobado de forma certera. Más de la mitad de los casos de LLC se descubre de forma casual en individuos asintomáticos.

Para establecer el pronóstico de los pacientes con LLC y poder clasificarlos, actualmente se utilizan los sistemas de estadificación de Rai y Binet; así como el grado de infiltración de médula ósea, cifra de linfocitos y alteraciones citogenéticas. Pero desafortunadamente, los sistemas de Rai y Binet no pueden identificar las formas estable o progresiva de la enfermedad y la heterogeneidad substancial aun dentro de las etapas clínicas, lo que ha conducido a la búsqueda de más factores pronósticos. En un porcentaje bastante elevado de pacientes con LLC hay evidencia de hipermutación somática en los genes de las IgV_H de las células leucémicas. Aquellos pacientes con genes IgV_H no mutados usualmente tienen una etapa avanzada de LLC a diferencia de aquellos con genes de IgV_H mutados y se ha demostrado que este estado mutacional es un factor muy certero para determinar el pronóstico, pero desafortunadamente la secuenciación de los genes de IgV_H no es una prueba de rutina y además es costosa. Por lo tanto, hay una búsqueda ardua de otros factores que puedan ayudar a determinar el pronóstico de los pacientes. Se ha visto que la presencia de ZAP-70 en las células leucémicas y la concentración elevada de β 2-m es de mal pronóstico para el paciente, así como también alteraciones sobre p53 (delección del gen).

Dentro de los factores pronóstico que se pueden utilizar para la LLC están la medición de beta2- microglobulina (β 2-m), que es una proteína que no está asociada covalentemente a la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I, la β 2-m se puede detectar en el suero. Se ha observado que niveles altos de β 2-m están asociados a un pronóstico adverso en la LLC, ya que estos valores tan altos han sido encontrados en pacientes con una supervivencia corta.

Otra proteína que se puede considerar como factor pronóstico es la proteína p53, la cual funciona como factor de transcripción para varios genes. p53 se activa cuando hay daño en el DNA y participa en procesos celulares como son regulación del ciclo celular, senescencia, apoptosis y reparación del DNA. Esta proteína se encuentra mutada en la mayoría de los canceres humanos aumentando así su vida media permitiendo su detección. Se ha observado que las mutaciones del gen p53 correlacionan con un mal pronóstico para el paciente con LLC.

La proteína ZAP-70 que tiene función de tirosincinasa y participa en la señalización de los linfocitos T interaccionando con el recetor de linfocitos T para lograr la activación y proliferación del linfocito, parece ser un factor pronóstico muy prometedor e importante en la LLC ya que la expresión de esta proteína se relaciona con un mal pronóstico debido a que en condiciones normales no debe estar presente en los linfocitos B que son las células características de la LLC. Además, su expresión se correlaciona con el estado mutacional de los genes de las cadenas pesadas de la región variable de las inmunoglobulinas presentes en la superficie de los linfocitos B, lo cual también permite utilizar a ZAP-70 para establecer un buen o mal pronóstico en lugar del estado mutacional de las inmunoglobulinas por sí solo.

OBJETIVO

Conocer el estado actual de la información acerca de las moléculas p53, ZAP-70 y β 2-Microglobulina como factores pronóstico en la Leucemia Linfocítica Crónica.

JUSTIFICACIÓN

La Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) es una enfermedad linfoproliferativa con un curso clínico altamente variable, dado que hay pacientes con una supervivencia muy prolongada, 10 a 15 años, en ocasiones libres de tratamiento; mientras que hay otros con una supervivencia que apenas llega a rebasar los dos años de vida.

Actualmente para establecer el diagnóstico de LLC, se basa en los sistemas de estadificación desarrollados por Rai et al(1975) y Binet et al(1981), como métodos estándar, pero estos sistemas tienen ciertas limitaciones como: identificar las formas estable o progresiva de la enfermedad.

Un factor que ha proporcionado información importante a cerca del mal o buen pronóstico de la enfermedad, es el estado mutacional de los genes de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgV_H), permitiendo separar a la LLC en dos subtipos; una LLC con genes de IgV_H mutados que se relaciona con buen pronóstico y una LLC con genes de IgV_H no mutados que se relaciona con mal pronóstico. El inconveniente de este factor es que hay que secuenciar los genes para establecer el estado mutacional, y esto sigue siendo todavía algo muy costoso para que se maneje como prueba de rutina en la mayoría de los laboratorios. Por lo tanto, se han estado buscando factores pronóstico sustitutos que correlacionen con el estado mutacional de los genes de IgV_H .

Por lo anterior, se pretende recopilar información de actualidad sobre factores pronóstico, específicamente p53, ZAP-70 y β 2-Microglobulina, que brinden información valiosa para poder establecer una correlación entre estos factores y las formas estable o progresiva de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfocítica crónica (LLC), es una enfermedad caracterizada por la proliferación y acumulación de linfocitos inmunoincompetentes de pequeño tamaño, aspecto maduro y fenotipo B. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se deben a la infiltración progresiva de la médula ósea, ganglios linfáticos y otros tejidos por dichas células, así como las alteraciones inmunológicas que acompañan a la enfermedad.

La LLC es la forma de leucemia más frecuente en los países occidentales, donde se presenta en personas de edad adulta, cuya incidencia aumenta con la edad. El curso clínico es sumamente variable: la media de supervivencia es de unos 10 años, pero hay pacientes que fallecen al poco tiempo de ser diagnosticados y otros, cuya esperanza de vida no se ve afectada por la enfermedad. Aunque en la mayoría de los casos la LLC es una enfermedad incurable, en los últimos años se han producido importantes progresos en su tratamiento (Montserrat E. 2005).

HISTORIA

La primera descripción de la LLC la efectuó Turk en 1903. En 1924 Minot e Issacs llevaron a cabo los primeros estudios sobre las particularidades clínicas y evolutivas de la LLC. Las bases sobre los conocimientos de esta forma de leucemia fueron establecidos por Galton en la Conferencia Burroughs Wellcome de 1965. A su vez Dameshk, en 1967, formuló la clásica definición de LLC como «enfermedad debida a la acumulación de linfocitos inmunoincompetentes». En 1975, Rai et al publicaron una clasificación de la LLC en estadios clínicos, lo que renovó el interés por esta enfermedad y dio un considerable impulso a los estudios clínicos y biológicos sobre la misma, desde una nueva perspectiva. En 1979, bajo la iniciativa de Binet, se constituyó el international Workshop on CLL (IWCLL) que agrupó a investigadores de muy diversos campos, particularmente interesados en la LLC y otros síndromes linfoproliferativos crónicos (Montserrat E. 2005).

EPIDEMIOLOGIA

La LLC es la leucemia más frecuente entre las personas adultas de los países occidentales. La edad media de los enfermos en el momento del diagnóstico es de unos 70 años, y la mayoría tiene 50 años ó más. Predomina ligeramente en los varones (1,5:1). La incidencia global es de 3/100 000 y aumenta de forma muy marcada con la edad. Así, mientras en los sujetos menores de 65 años la incidencia es de 1,2/100 000, en adultos de igual o superior a los 65 años es de 19,7/100 000. La incidencia de LLC varía según los países. En este sentido, mientras en EE.UU y Europa la LLC representa alrededor del 30-40% de las leucemias, en los países orientales, como Japón o China, sólo constituye el 3 al 10% de todas las leucemias. Las poblaciones china y japonesa emigradas a países occidentales no tienen a lo largo de generaciones una mayor incidencia de LLC. Por otra parte, dentro de un mismo país puede haber variaciones geográficas en la incidencia de LLC. Los estudios efectuados para intentar relacionar la LLC con las características socioeconómicas de los pacientes no han aportado resultados concluyentes. A diferencia de lo que ocurre en otras leucemias, no existe relación entre la LLC y la exposición a radiaciones ionizantes (Montserrat E. 2005).

ETIOLOGÍA

La causa de la LLC no se conoce. Sin embargo, existen ciertos factores relacionados con la enfermedad. El riesgo de padecer esta dolencia entre los familiares en primer grado de una persona con LLC se estima que es 2-7 veces superior al de los sujetos control. En alrededor del 10% de los parientes en primer grado de los pacientes con LLC es posible demostrar, mediante citometría de flujo, en sangre periférica la presencia de una población clonal con inmunofenotipo idéntico al de la LLC. Dicha población también puede ponerse de manifiesto en el 2-3% de la población general. El significado y la trascendencia clínica de este hecho se desconocen. En los casos de LLC familiar, la enfermedad aparece de

forma más temprana, unos 10 a 15 años antes, en los miembros de la segunda generación (fenómeno de anticipación) (Montserrat E. 2005).

- Alteraciones cromosómicas y genes

Se hallan alteraciones cromosómicas en alrededor de 80% de casos. Las más frecuentes son: del(13q14) (55% de casos), del(11q22-q23) (18%), +(12q13) (16%), del(17p13) (7%) y del(6q21) (6%), y estas se enlistan en la tabla 1. En una tercera parte de los casos existen de alteraciones citogenéticas adicionales durante el curso de la enfermedad (Montserrat E. 2005).

Tabla 1. Correlación entre anomalías citogenéticas y características clinicoevolutivas (Montserrat E. 2005).

Anomalia citogenética	Características
Del(13q) aislada	Buen pronóstico
Trisomía 12	Presencia de prolinfocitos en sangre periférica Inmunofenotipo atípico (ej. , FMC7+, CD11c+ Sin influencia en el pronóstico
Del(6q)	Pacientes jóvenes, predominio en varones, formas tumorales de la enfermedad Sin influencia en el pronóstico
Del(11q)	Pacientes jóvenes, predominio en varones, formas tumorales de la enfermedad y resistentes al tratamiento Mal pronóstico
Del(17p)	Formas progresivas de la enfermedad, resistencia al tratamiento Muy mal pronóstico

La relación entre LLC y determinados genes (ej. BCL-1, BCL-2, BCL-3) dista de ser clara. Así, en algunos casos de LLC se halla la t(11;14) (q13;q32), debido a la cual el gen BCL-1, localizado en condiciones normales en el cromosoma 11, se sitúa en el cromosoma 14, en una zona próxima al gen de las inmunoglobulinas. Sin embargo, dicha alteración es más propia del linfoma del manto. Por su parte, en unos pocos casos se ha encontrado la t(14;18) (q32;q21), propia de los linfomas foliculares. En condiciones normales, el gen BCL-2 previene

la apoptosis o muerte programada de las células. En la LLC, a pesar de la ausencia casi constante de la t(14;18), las proteínas BCL-2 se hallan habitualmente incrementadas, mientras que las del grupo BAX (proapoptosis) suelen ser bajas; ello se relaciona con los defectos de la muerte celular programada de los linfocitos de la LLC y su acumulación, en forma de células en fase G0/G1 del ciclo celular, a lo largo del tiempo. En algunos casos se ha descrito la t(14;19) (q32;q13) relacionada con un cambio posicional del gen BCL-3. Por último, en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14) se han descrito diversos genes que podrían desempeñar un papel importante en el origen de la LLC. Asimismo, alrededor del 20% de los casos presentan defectos del gen ATM (gen de la ataxia-telangiectasia), situado en el brazo largo del cromosoma 11 (Montserrat E. 2005).

- **Características del linfocito en la LLC**

El linfocito de la LLC forma parte de las células B CD5+. De forma característica, posee inmunoglobulinas de superficie (Smlg), aunque en número inferior a la de los linfocitos normales. Estas Smlg son IgM ó IgM + IgD, y sus cadenas ligeras son kappa ó lambda. Además, el linfocito de la LLC tiene antígenos de superficie característicos de los linfocitos B (HLA-DR, CD19, CD20, CD21, CD23, CD24). Los genes de las inmunoglobulinas se hallan reordenados con un patrón idéntico (reordenamiento monoclonal).

La contrapartida normal del linfocito de la LLC se halla en la zona del manto de los folículos linfoides. Alrededor de 50% de los casos tienen mutaciones somáticas de los genes de las inmunoglobulinas (IgVH), lo que sugiere un origen de la enfermedad con memoria inmunológica en células B posgerminales. En el resto de casos, los genes IgVH no están mutados; en tales casos, la LLC surgiría a partir de células B pregerminales (Montserrat E. 2005).

- **Alteraciones de la inmunidad**

La hipogammaglobulinemia es una manifestación usual de la enfermedad (20-60% de casos). El origen de la hipogammaglobulinemia es, posiblemente, multifactorial: alteraciones funcionales de las células B, infiltración masiva de médula ósea con disminución de las células productoras de inmunoglobulinas, alteraciones en la subpoblaciones T, actividad supresora de las células NK, intervención de diversas citocinas. También se han descrito alteraciones del complemento y de la función granulomonocitaria. Debido a la hipogammaglobulinemia, se considera que los enfermos no producen cantidades adecuadas de anticuerpos después de ser vacunados, y están especialmente predispuestos a contraer infecciones (Monserrat E. 2005).

Se han descrito diversas alteraciones de los linfocitos T. Entre ellas, las más importantes son el incremento en la cifra absoluta de los mismos y la alteración del cociente CD4/CD8 en sangre periférica; en la médula ósea, sin embargo, las células CD4+ se hallan incrementadas. El crecimiento de colonias de linfocitos T en cultivo suele estar disminuido. También se han descrito alteraciones en la actividad T cooperadora. Todas estas anomalías se atribuyen a la secreción por parte de los linfocitos B neoplásicos de diversas citocinas. El papel de estas citocinas (ejemplo, IL-2, IL-4, IL-6, TNF) en la patogenia y en las alteraciones inmunológicas de la LLC es complejo, pero se sabe que intervienen de forma paracrina o autócrina en la patogenia de la enfermedad. En muchos casos, existe una expresión anómala del ligando para el receptor CD40 en los linfocitos T, lo que dificultaría la función de inmunorregulación de los linfocitos T sobre los B neoplásicos. Por otra parte, los pacientes con LLC tienen disminuida la actividad natural killer (NK), pero el número de células NK suele ser normal o incluso esta incrementado (Monserrat E. 2005).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Más de la mitad de los casos de LLC se descubre de forma casual, en personas asintomáticas, al detectarse en un análisis una leucocitosis con linfocitosis. En el resto de casos, la astenia, la aparición de adenopatías o las infecciones repetidas son las manifestaciones que llevan al diagnóstico. A diferencia de lo que ocurre en los linfomas, la fiebre, sudoración y pérdida de peso son poco frecuentes como forma de presentación de la enfermedad (Montserrat E. 2005).

La exploración física puede ser completamente normal. En cerca del 40% de los pacientes se detectan adenopatías de carácter simétrico. Las adenopatías mediastínicas o la infiltración del anillo linfático de Waldeyer son sumamente infrecuentes. El bazo suele palparse en el 20 -30% de los casos. No es extraño el hallazgo de hepatomegalia. De forma excepcional, pueden detectarse infiltrados linfoides en diversos tejidos, como piel, riñón, glándulas lagrimales o salivales, pulmón u otros. En estos casos, sin embargo, es obligado descartar una segunda neoplasia o la progresión de la enfermedad a linfoma. Se han descrito casos de síndrome nefrótico acompañando a la LLC, así como la hipertensión portal por hiperplasia nodular regenerativa del hígado, inducida por la infiltración linfoide del mismo (Montserrat E. 2005).

Cabe destacar que determinadas alteraciones citogenéticas se correlacionan con formas de la enfermedad con peculiaridades clínicas y evolutivas. Así, la trisomía 12 cursa con la presencia en sangre periférica de linfocitos de morfología atípica, sobre todo prolinfocitos, y marcadores inmunofenotípicos poco habituales en la LLC, como la posibilidad para el FMC7, antígeno de 105 kDa presente en una subpoblación de células B funcionalmente maduras. A su vez, la del(11q) se observa sobre todo en varones relativamente jóvenes, con formas tumorales de la enfermedad, progresivas y resistentes al tratamiento. Por último, la del(17p) es frecuente en las transformaciones de la enfermedad, y se asocia con mala respuesta a la quimioterapia (Montserrat E. 2005).

COMPLICACIONES

Las complicaciones más frecuentes son las infecciones, los fenómenos autoinmunes, la transformación de la enfermedad y las segundas neoplasias.

- Infecciones

Se observan sobre todo en las fases avanzadas de la enfermedad, y se deben a las alteraciones de la inmunidad que acompañan a la LLC y a las complicaciones derivadas del tratamiento. Son, sobre todo, de origen bacteriano y localización pulmonar; las infecciones virales, en especial por virus herpes, son asimismo muy frecuentes. En los pacientes tratados con los análogos de las purinas o anticuerpos monoclonales no son raras las infecciones por agentes oportunistas (*Pneumocystis carinii*, *CMV*, *Legionella sp*, *Listeria sp*, micobacterias atípicas). Las infecciones son la primera causa de morbilidad y mortalidad (Montserrat E. 2005).

- Fenómenos autoinmunes

La prueba de Coombs es positiva en 15-35% de los casos, bien al inicio de la enfermedad, o durante su evolución. Los anticuerpos suelen ser del tipo IgG. En ocasiones, la positividad de la prueba de Coombs no va acompañada de una anemia hemolítica franca. Otras veces es el tratamiento quimioterápico el que precipita la aparición de una hemólisis autoinmune clínicamente evidente. Menos frecuente es la trombocitopenia de tipo inmune. En raras ocasiones, la LLC se asocia con aplasia pura de la serie roja, cuyo diagnóstico, cuando la médula ósea está intensamente infiltrada por linfocitos, no siempre es fácil (Montserrat E. 2005).

- Transformación de la enfermedad

La forma más habitual (5-10% de casos) es la transformación prolinfocitoide, situación en la que en la sangre periférica coexisten linfocitos maduros con prolinfocitos (arbitrariamente, hasta 55%, a partir del cual se establece el diagnóstico de leucemia prolinfocítica). A su vez, en 3-10% de los pacientes se asiste a la aparición de un linfoma de células grandes (síndrome de

Richter), posibilidad que debe sospecharse siempre que el paciente sufra un empeoramiento inexplicado del estado general, fiebre, aumento de tamaño de los ganglios linfáticos o del bazo, incremento de la LDH sérica o hipercalcemia. En cerca de la mitad de los casos, el linfoma surge a partir de la transformación de la clona propia de la LLC y el fenómeno de la transformación se asocia con infección por el VEB. A diferencia de lo que ocurre en la leucemia mieloide crónica, es excepcional que la LLC acabe en forma de leucemia aguda (menos del 0,1% de casos). Asimismo, también es posible la aparición de un mieloma múltiple que, en la mayoría de los casos, corresponde a un fenómeno *de novo*, no relacionado con la clona celular de la LLC (Monserrat E. 2005).

- **Segundas neoplasias**

La incidencia de neoplasias en los enfermos con LLC es superior a la de la población general. Alrededor de 10% de los pacientes presentan esta complicación. Se trata, por lo general, de carcinomas de piel, tubo digestivo y pulmón. Las segundas neoplasias pueden aparecer de forma previa, simultánea o tras el diagnóstico de la LLC, en cuyo caso no guardan necesariamente relación con el tratamiento.

De forma más excepcional, se han descrito casos de LLC asociados con la enfermedad de Hodgkin, leucemia mieloide crónica, trombocitemia esencial, policitemia vera, tricoleucemia, mielodisplasias o leucemia aguda mieloblastica (Monserrat E. 2005).

PRUEBAS DE LABORATORIO

El dato más característico es la leucocitosis, que suele estar comprendida entre 20 y $150 \times 10^9/L$, con una linfocitosis superior a 75%. Los linfocitos son de pequeño tamaño, con un núcleo redondeado, cromatina condensada en grumos y escaso citoplasma; estas células son anormalmente frágiles, y se rompen con facilidad al efectuar las extensiones de sangre periférica, dando lugar a las típicas sombras de Gumprecht. Puede haber un pequeño porcentaje, en general inferior a 10%, de otros linfocitos (prolinfocitos, centrocitos, centroblastos). En 15-20% de

los casos se observa anemia de forma inicial. La plaquetopenia es menos frecuente. Las concentraciones séricas de ácido úrico, LDH, beta-2-microglobulina y bilirrubina total pueden elevarse. La hipogammaglobulinemia es muy frecuente (20-60% de casos), sobre todo en pacientes con edad avanzada. En 5-10% de casos puede detectarse gammapatía monoclonal (sobre todo, IgM o IgG).

Mediante el estudio por FISH se hallan alteraciones citogenéticas en 80% de los casos siendo las alteraciones más frecuentes la del(13q14) (55% de casos), del(11q22-q23) (18% de casos), +(12q13) (16%), del(17p13) (13%) y del(6q21) (6%).

El aspirado de médula ósea revela infiltración por elementos linfoides, por lo general superior a 30%. En la biopsia medular se han identificado diferentes patrones de infiltración: nodular, intersticial, mixto y difuso. El grado de infiltración de la médula ósea es un buen reflejo de la masa tumoral. A efectos de valoración pronóstica de la enfermedad es suficiente con distinguir la infiltración difusa y la no difusa de la médula ósea.

Los ganglios linfáticos presentan infiltración difusa por linfocitos de pequeño tamaño. Al lado de los linfocitos de aspecto maduro pueden observarse otros de aspecto atípico. Se distinguen tres patrones histopatológicos: a) difuso: infiltración prácticamente absoluta por linfocitos pequeños; b) seudofolicular: existencia de agregados celulares formados por prolinfocitos y parainmunoblastos (que aparecen como centros claros en el corte histológico), y c) tumoral: amplias zonas del ganglio linfático se hayan infiltradas por abundantes linfocitos atípicos y, ocasionalmente, células que recuerdan a las de Reed- Sternberg.

En el bazo hay una infiltración que ocupa, principalmente, la pulpa blanca en forma de nódulos linfoides, sin centro claro reactivo; la pulpa roja, sin embargo, también puede hallarse infiltrada. En las fases más avanzadas del proceso, puede haber infiltración de los sinusoides esplénicos y de los cordones medulares (Montserrat E. 2005).

DIAGNÓSTICO

El international Workshop on CLL y el National Cancer Institute-Sponsored Working Group han propuesto, de forma independiente, una serie de requisitos mínimos para el diagnóstico de LLC. En esencia, son los siguientes: a) linfocitosis mantenida, por lo general superior a $10 \times 10^9/L$; b) morfología típica; con menos de 10% de células de aspecto inmaduro; c) fenotipo compatible con LLC: expresión de cadenas kappa o lambda; Smlg de poca intensidad; positividad para los antígenos CD5, CD19, CD20 (débil) y CD23, y d) infiltración de la médula ósea superior a 30% y/o biopsia medular compatible con LLC.

Sin embargo, el diagnóstico de LLC puede establecerse siempre que se demuestre incremento en la cifra de linfocitos en sangre periférica, de naturaleza clonal y con el inmunofenotipo característico de la enfermedad, sin que sea imprescindible demostrar la infiltración de la médula ósea.

Desde el punto de vista morfológico, no todos los casos de LLC tienen el aspecto típico de esta enfermedad. Al lado de formas típicas, en las que la proporción de linfocitos atípicos en sangre periférica es igual o inferior a 10%, existen formas atípicas, en las que existe una proporción variable de células linfoides atípicas (sobre todo prolinfocitos, pero también en ocasiones linfocitos grandes y, más raramente, células hendidas o centrocitos). Estas últimas suelen asociarse a la trisomía 12, como alteración citogenética, y también muestran un inmunofenotipo atípico (ej., CD5-, FMC7+, CD11c+, Smlg de fuerte intensidad). Como norma, no debe aceptarse el diagnóstico de LLC atípica sin haber descartado antes otras posibilidades diagnósticas (Monserrat E. 2005).

Además de las pruebas meramente diagnósticas, los pacientes con LLC deben someterse a una serie de exploraciones con el fin de valorar el grado de carga tumoral, las complicaciones y el pronóstico de la enfermedad. En la tabla 2 se muestran las pruebas fundamentales para el estudio de los enfermos con LLC (Monserrat E. 2005).

Tabla 2. Pruebas realizadas a los pacientes con LLC (Montserrat E. 2005).

<p>En todos los casos</p> <p>Anamnesis:</p> <ul style="list-style-type: none">- Antecedentes familiares de LLC u otras neoplasias- Antecedentes personales de infecciones, neoplasias- Enfermedades asociadas <p>Exploración física:</p> <ul style="list-style-type: none">- Adenopatías- Esplenomegalia- Hepatomegalia <p>Laboratorio:</p> <ul style="list-style-type: none">- Hemograma completo incluyendo recuento de reticulocitos- Recuento de plaquetas- Prueba de Coombs- Pruebas de funcionalismo hepático y renal- Serología para virus de hepatitis- LDH sérica- Beta-2 microglobulina sérica- Proteinograma- Aspirado/biopsia de médula ósea- Marcadores celulares <p>En casos seleccionados</p> <ul style="list-style-type: none">- Biopsia ganglionar- Biopsia de tejidos u órganos presumiblemente afectados- TC toracoabdominal y otras pruebas de imagen- Dosificación de inmunoglobulinas séricas- Inmunoelectroforesis- Citogenética- Biología molecular
--

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos con expresión leucémica se basa, fundamentalmente, en el estudio integrado de la morfología de las células leucémicas y de su inmunofenotipo. Asimismo la citogenética y la biología molecular pueden aportar información muy importante para el diagnóstico.

El diagnóstico de la mayor parte de las LLC no suele presentar excesivas dificultades. Con todo, en algunos casos pueden plantearse dudas con otros síndromes linfoproliferativos (Montserrat E. 2005). En la tabla 3 se muestran las

principales características inmunofenotípicas de la LLC y otros síndromes linfoproliferativos de células B con los que puede plantearse el diagnóstico diferencial. Así mismo en la figura 1 se presenta un diagrama que puede ayudar en el diagnóstico diferencial.

Tabla 3.- Inmunofenotipo de Leucemias/Linfomas de células B ().

Enfermedad	slg	CD5	CD10	CD11c	CD19	CD20	CD22	CD23	CD25	CD103
LLC	+/-	++	-	+/-	+	+/-	+/-	++	+/-	-
L. Prolinfocítica	++	+	-	+/-	+	+/-	+	+/-	-	-
L. Cels. Peludas	+/-	+/-	-	++	+	+	++	+/-	+	-
Linfoma de Cels. Del Manto	+	++	-	-	+	+	+	+/-	-	-
Linfoma zona marginal	+	+/-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	-	-
Linfoma linfoplasmocitoide	+/-	+/-	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-
Linfoma centro folicular	+	-	-	-	+	++	+	+/-	-	-

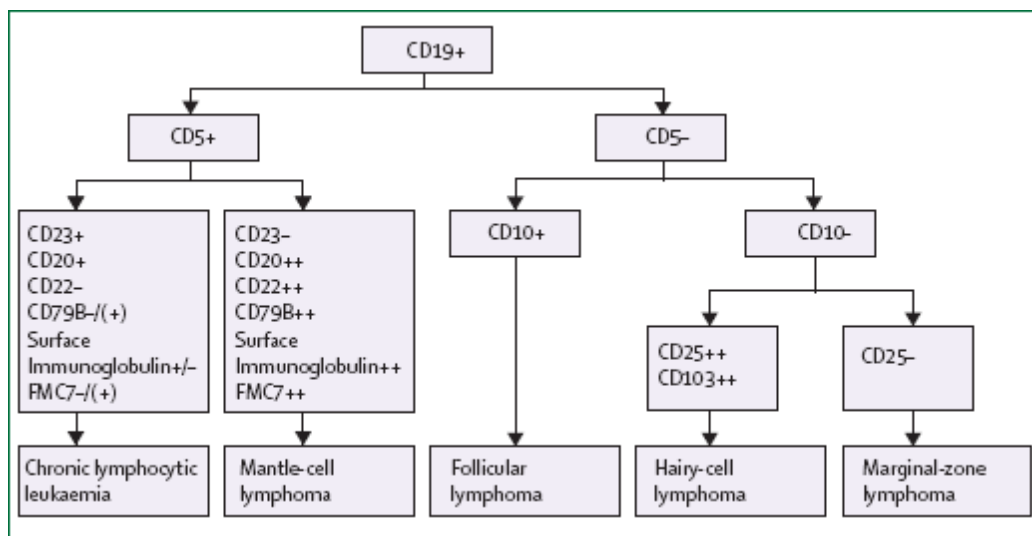


Figura 1. Diagnóstico diferencial basado en el inmunofenotipo (Dighiero G. 2008).

La leucemia prolinfocítica cursa con leucocitosis extremas (por lo general, superiores a $100 \times 10^9/L$) con abundantes prolinfocitos (>55%) en sangre

periférica y esplenomegalia. Los prolinfocitos son de mayor tamaño que los linfocitos, poseen nucléolos y tienen más citoplasma. A diferencia de los linfocitos de la LLC, los prolinfocitos poseen Smlg intensa, y son FMC7 y CD79b positivos y CD23 negativos. En cerca de dos terceras partes de los enfermos se halla un cromosoma marcador 14q+ (14q32), y con menos frecuencia puede detectarse la t(11;14)(q13;q32). Por otra parte, cabe señalar que existen formas intermedias entre la LLC y la LPL. Así, por ejemplo, en la denominada LLC/LPL el número de prolinfocitos se sitúa entre 11 y 54%. Mientras en algunos casos el cuadro de LLC/LPL es patente desde el diagnóstico de la LLC clásica (Monserrat E. 2005).

La tricoleucemia también puede plantear problemas de diagnóstico diferencial, sobre todo en su forma variante, en la que la cifra de leucocitos es alta y los linfocitos tienen una morfología intermedia entre los prolinfocitos y los tricoleucocitos. En la forma clásica las células de la tricoleucemia son fuertemente positivas para la Smlg, y expresan antígenos pan-B, así como CD25, CD11c y CD103. Las formas variantes suelen ser CD25 y CD103 negativas. El diagnóstico diferencial con los linfomas foliculares leucemizados suele ser fácil debido a la presencia en éstos de células centrofoliculares, con el núcleo habitualmente hendido, fuerte positividad de la Smlg, negatividad del CD5 y ocasional positividad para el CD10 y CD22. En 80% de casos se halla la t(14;18).

En el llamado linfoma esplénico de células vellosas (linfoma de la zona marginal del bazo) lo más llamativo es la esplenomegalia, moderada leucocitosis con linfocitos, que recuerdan los de la tricoleucemia, frecuente componente M en suero y marcadores de membrana parecidos a los que se observan en la tricoleucemia.

Más difícil puede resultar el diagnóstico diferencial con el linfoma de células del manto leucemizado, ya que en él los linfocitos son CD25+, al igual que los de la LLC. Sin embargo, el linfoma de células del manto suele ser CD23- y tiene una alteración cromosómica característica, la t(11;14)(q13;q32).

En los linfomas linfoplasmocitoides puede observarse una moderada leucocitosis, con células linfoplasmocitarias; en el suero existe un componente monoclonal IgM (macroglobulinemia de Waldenstrom).

Además de los síndromes linfoproliferativos B, deberán tenerse en cuenta los de origen celular T (leucemia prolinfocítica, síndrome de Sézary, leucemia/linfoma T del adulto), así como la leucemia de linfocitos grandes granulares (Montserrat E. 2005).

FACTORES PRONÓSTICOS

El curso clínico es muy variable. La mediana de supervivencia es de 8-10 años. Mientras algunos paciente fallecen pocos meses después del diagnóstico, otros no ven modificada su esperanza de vida. De forma excepcional (1% de casos) puede asistirse a la remisión «espontánea» de la enfermedad, a veces después de que el enfermo haya sufrido una infección viral.

La introducción de estadios clínicos significó un gran avance en el pronóstico de la LLC. Los sistemas más utilizados son el de Rai (tabla 4) y el de Binet (tabla 5).

Además de los estadios clínicos el grado de infiltración de la médula ósea, la cifra de linfocitos en sangre periférica, el tiempo de duplicación linfocitario, el número de prolinfocitos en sangre periférica y las alteraciones citogenéticas son los parámetros pronósticos más importantes. El valor de otros datos, como edad, sexo, fenotipo linfocitario, tasa de LDH, **β -2-microglobulina** y timidina-cinasa sérica o concentraciones séricas de CD22 o CD23 es más controvertido; de todos ellos, los más importantes son la tasa de beta-2-microglobulina y timidina-cinasa séricas (Montserrat E. 2005., Faramarz N. 2008).

Tabla 4. Estadios de Rai (Montserrat E. 2005).

Categoría	Mediana de supervivencia (años)	Supervivencia a los 10 años (%)
Riesgo bajo Estadio 0 – linfocitosis aislada	16	65
Riesgo intermedio Estadio I .- linfocitosis + adenopatías Estadio II .- linfocitosis + hepatomegalia y/o esplenomegalia	8	45
Riesgo alto Estadio III .- linfocitosis + anemia (Hb <11 g/dL) Estadio IV.- linfocitosis + plaquetopenia (plaquetas <100 X 10 ⁹ /L)	2.5	15

Tabla 5. Estadios de Binet (17).

Categoría	Mediana de supervivencia (años)	Supervivencia a los 10 años (%)
Riesgo bajo Estadio A.- linfocitosis < 3 áreas linfoides afectadas	15	65
Riesgo intermedio Estadio B.- linfocitosis ≥ 3 áreas linfoides afectadas	5	25
Riesgo alto Estadio C.- anemia (Hb < 100 g/L) y/o plaquetopenia (< 100 X 10 ⁹ /L)	2.5	15

Por otra parte, las formas con mutaciones somáticas de los genes IgV_H tienen mejor pronóstico que aquellas en las que dichos genes no se hallan mutados. La expresión de CD38 parece relacionarse de forma inversa con las mutaciones de los genes IgV_H. Recientemente, se ha demostrado que la expresión de la proteína ZAP-70 en los linfocitos B neoplásicos propios de la LLC se correlaciona de forma muy estrecha con las mutaciones de los genes IgV_H, y su determinación, que puede hacerse mediante citometría de flujo, tiene importante valor pronóstico (Montserrat E. 2005). En la tabla 6 se resumen los factores pronóstico para la LLC.

Tabla 6. Factores pronósticos en la Leucemia Linfocítica Crónica (Faramarz N. 2008).

Factor	De bajo riesgo	De alto riesgo
Genero	Femenino	Masculino
Etapa clínica		
Binet	A	C
Rai	0	III y IV
Morfología de linfocitos	Típica	Atípica
Infiltración de médula ósea	No difusa	Difusa
Niveles elevados de β2-microglobulina y CD23	No presentes	Presentes
Expresión de CD38	Negativo	Positivo
ZAP-70	Negativo	Positivo
Estado de IgV _H	Mutado	No mutado
Citogenética	Normal o del(13q14)	Del(17p13) o del(11q22)

Si bien las anomalías citogenéticas, especialmente deleciones de 11q y 17p se ha demostrado que relacionan con la supervivencia corta, estos cambios pueden no estar presentes tempranamente en la enfermedad, sino ser adquiridos durante la progresión de la enfermedad (Montserrat E. 2005).

Las etapas de la enfermedad y otros factores pronósticos (grado de infiltración de médula ósea, niveles de linfocitos en sangre, tiempo de doblaje de linfocitos, morfología de los linfocitos, niveles séricos de LDH) son una mera reflexión de la diversidad biológica de la enfermedad.

Los sistemas de estadificación desarrollados por Rai y Binet, no permiten identificar las formas estable o progresiva de la enfermedad y la heterogeneidad substancial aún dentro de las etapas clínicas ha conducido a la búsqueda de más factores pronósticos relevantes (Montserrat E. 2005).

Estado mutacional de los genes IgV_H

Debido a que la mutación de IgV_H subyace al proceso de maduración por afinidad y aparece en el centro germinal de los folículos linfoides secundarios, tales casos hipermutados han sido considerados para ser expansiones clonales de LB (memoria) del centro postgerminal.

La presencia o ausencia de mutaciones somáticas en las regiones variables de los genes de las cadenas pesadas del BCR distinguen entre dos subtipos de enfermedad confiriendo información pronóstica importante (Wiestner A. 2003).

Cerca de 50 – 70% de los pacientes con LLC tienen evidencia de hipermutación somática en los genes de las IgV_H de las células leucémicas. Es importante notar que los pacientes con genes IgV_H no mutados usualmente tienen una etapa avanzada de LLC y unas características citogenéticas no favorables, requieren terapia y tienen una supervivencia corta. En contraste, aquellas células leucémicas que tienen genes IgV_H mutados usualmente expresan un estadio clínico temprano, frecuentemente tiene deleciones cromosómicas 13q14, no tienen

alteraciones de p53, no requieren terapia y tienen una supervivencia larga (Crespo M 2003., Dighiero G 2008., Montillo M 2005).

La supervivencia media en pacientes cuyas células expresan genes IgV_H no mutados oscila entre 79 y 119 meses. En contraste, los pacientes cuyas células expresan genes IgV_H mutados tienen una supervivencia media distinta más amplia, alcanzando 293 meses (figura 2), y muchos pudieron nunca requerir tratamiento (Wiestner A 2003., Montillo M. 2005).

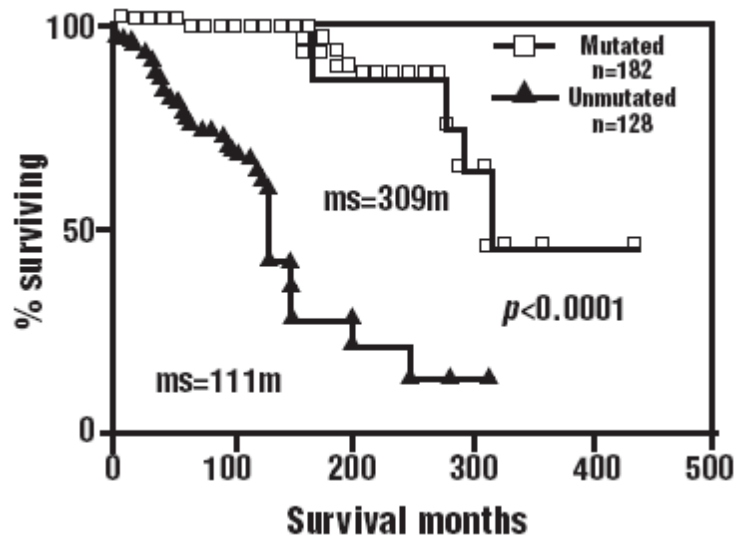


Figura 2. Curva de supervivencia de pacientes con LLC, con genes IgV_H mutados y no mutados (Montillo M. 2005).

El estado mutacional de IgV_H contiene información pronóstica importante y es independiente de otros factores que incluyen anomalías cromosómicas y conteo de leucocitos, pero la secuenciación de IgV_H no es cómoda para la mayoría de los laboratorios clínicos, dado que no tienen la capacidad de rutina para secuenciar, además de que este procedimiento es demasiado costoso (Wiestner A 2003., Montillo M. 2005).

Por lo tanto, se ha puesto en marcha una búsqueda de factores pronóstico sustitutos que relacionen con el estado mutacional de los genes IgV_H.

β 2- microglobulina (β 2-m)

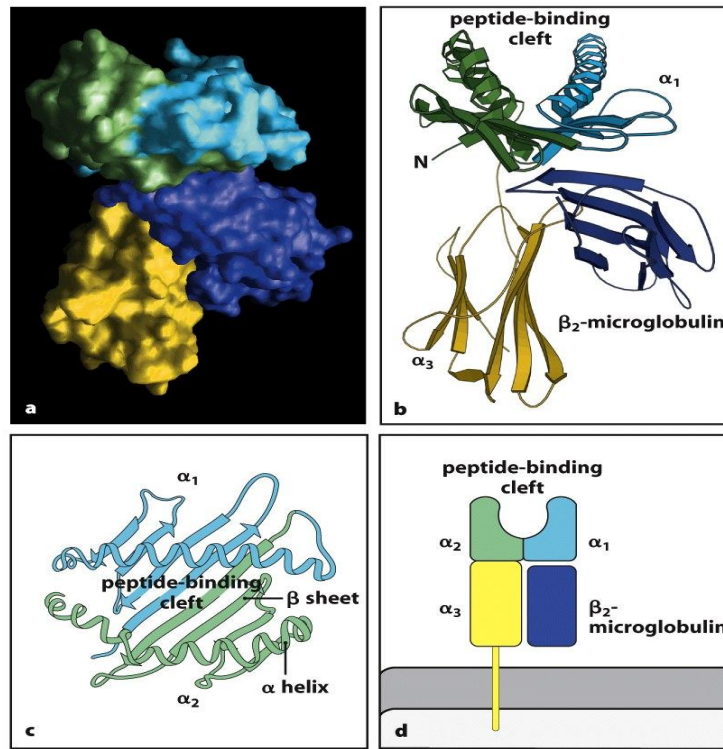


Figura 3. Estructura de una molécula del MHC de clase I determinada por cristalografía radiográfica. En el panel **a** se muestra una representación gráfica computarizada de una molécula de MHC de clase I humano, HLA-A2, que se ha separado de la superficie celular mediante la enzima papaína. Se muestra la superficie de la molécula, coloreada de acuerdo con los dominios mostrados en los paneles **b-d**, y se describe a continuación. Los paneles **b y c** muestran un modelo de listones de dicha estructura. En el panel **d** se presenta la molécula de MHC de clase I en forma esquemática, es un heterodímero formado por una cadena transmembranal alfa (peso molecular 43 kD) unida de modo no covalente a la microglobulina β 2 (12kD), que no atraviesa la membrana. La cadena alfa se pliega para formar tres dominios: alfa 1, alfa 2 y alfa 3. El dominio alfa 3 y la microglobulina β 2 muestran similitudes en la secuencia de aminoácidos con los dominios C de inmunoglobulina y tienen estructuras plegadas similares, mientras que los dominios alfa 1 y alfa 2 se pliegan juntos en una estructura única que consta de dos hélices alfa separadas que yacen sobre una lámina de ocho segmentos β antiparalelos. El pliegue de los dominios alfa 1 y alfa 2 crea un surco largo, que es el sitio en el cual los antígenos peptídicos se unen a las moléculas de MHC. La región transmembranal y el fragmento corto de péptido que conecta los dominios externos a la superficie celular no se observan en los paneles **a y b** porque la digestión con papaína los eliminó. Como puede observarse en el panel **c**, donde se observa la molécula desde arriba, los lados de la hendidura están formados por las caras internas de las dos hélices alfa; la lamina β plegada formada por el apareamiento de los dominios alfa 1 y alfa 2 crea el piso de la hendidura (Kenneth M. 2009).

La β 2-m es un polipéptido no glicosilado de 11.6 KDa compuesto por 100 aminoácidos, la información para su síntesis esta codificada en el cromosoma 15 (Figura 3). Es la cadena invariable de las moléculas de MHC-I sobre la superficie celular de todas las células nucleadas. Su función mayor es interactuar y estabilizar la estructura terciaria de la cadena alfa del MHC-I (Figura 4). No está

asociada covalentemente con la cadena alfa de la molécula MHC-I y no tiene ninguna fijación a la membrana celular, las moléculas MHC-I se expresan ubicuamente en la mayoría de las células somáticas y éstas moléculas, son esenciales en la respuesta inmune debido a que ellas presentan péptidos derivados del antígeno a LT CD8 citotóxicos y además, son importantes en la protección en contra de la citotoxicidad mediada por las células NK (natural killer). También está asociada con moléculas MHC tipo Ib como son HLA-E, F, G (Xie J. 2003., Gobin S. J. P. 2003).

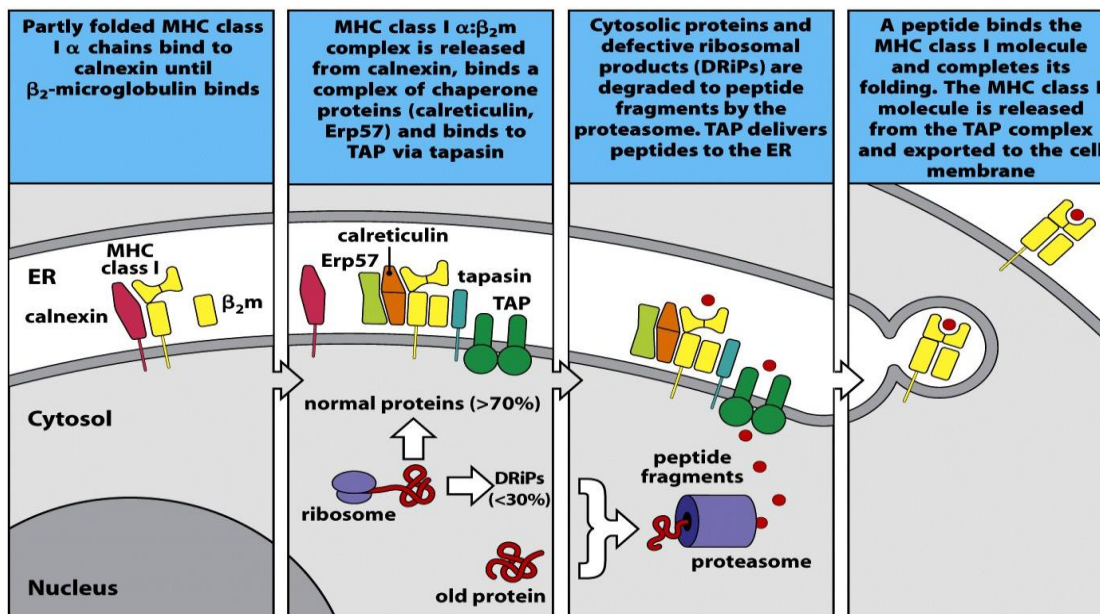


Figura 4. Las moléculas del MHC de clase I no abandonan el retículo endoplásmico a menos que se unan a péptidos. Las cadenas alfa del MHC de clase I recién sintetizadas se ensamblan en el retículo endoplásmico con una proteína unida a la membrana, la calnexina. Cuando este complejo se une a la microglobulina β_2 , el dímero de MHC de clase I alfa: β_2 m se disocia de la calnexina y a continuación la molécula del MHC de clase I parcialmente plegada se une al transportador de péptidos TAP por medio de interacción con una molécula de la proteína asociada con TAP tapasina. Los chaperones calreticulina y Erp57 también se unen para formar parte de este complejo. La molécula del MHC de clase I se retiene dentro del retículo endoplásmico hasta que es liberada por la unión de un péptido, que completa el plegamiento de la molécula del MHC. Incluso en ausencia de infección, hay un flujo continuo de péptidos del citosol al interior del RE. Los productos ribosomales defectuosos (DRiP) y las proteínas antiguas marcadas para destrucción son degradados en el citoplasma por el proteasoma para generar péptidos que se transportan a la luz del RE por medio de la TAP, y algunos se unirán a moléculas de MHC de clase I. Una vez que un péptido se ha unido a la molécula del MHC, el complejo péptido: MHC abandona el RE, es transportado a través del aparato de Golgi y por último a la superficie celular (Kenneth M. 2009).

La β_2 -m es compañera de HFE (formalmente llamada HLA-H), una molécula parecida a MHC-I, que es importante para la captación de Fe mediada por transferrina. Además, la β_2 -m también es capaz de formar un dímero con el receptor Fc neonatal, el cual es importante para el transporte fetomaterno de IgG

(Gobin S.J.P. 2003). Estas funciones necesitan de un control estricto de transactivación de la β 2-m para asegurar una expresión adecuada en una variedad de tejidos y tipos celulares. La transactivación de β 2-m está regulada por varias citocinas como: TNF- α , IFN- α , IFN- β e IFN- γ . Esto es de importancia biológica para coordinar la expresión mediada por citocinas de todos los genes involucrados en la vía de presentación de antígeno por MHC-I, que incluyen β 2-m y moléculas MHC-I, durante la inflamación o infección (Xie J. 2003).

La β 2-m presente en la superficie celular puede cambiar con la presencia de β 2-m libre en suero. La β 2-m se encuentra en fluidos corporales bajo condiciones fisiológicas como resultado de la muda de las superficies celulares o liberación intracelular, y es metabolizada casi exclusivamente dentro del riñón, 95 a 100% de la β 2-m en circulación es eliminada a través de la filtración glomerular. En personas sanas, la concentración sérica de β 2-m usualmente es menor a 2 mg/L, y la excreción urinaria es menor de 400 μ g/24 hrs.

Las consecuencias clínicas de la expresión aberrante de β 2-m, es una respuesta inmune comprometida debido a la falta de presentación de antígeno, al igual que un metabolismo de hierro alterado (Xie J. 2003., Gobin S. J. P 2003).

En personas infectadas con VIH, los niveles altos de β 2-m sérica correlacionan con la progresión a SIDA, mientras que en las enfermedades hematológicas (mieloma múltiple, linfoma, leucemias) los niveles correlacionan con un pobre pronóstico (Gobin S. J. P. 2003).

En concentraciones altas, puede tener efectos negativos en el sistema inmune.-

- La β 2-m puede inducir anormalidades morfológicas y fenotípicas y alterar la secreción de citocinas.
- Hay capacidad dañada en la presentación de antígeno.
- Retardan la diferenciación de monocitos y alteran la expresión de citocinas.
- Pobre morfología, baja expresión de MHC-I, CD1a, y moléculas co-estimuladoras CD40 y CD80.
- Algunas células pueden secretar IL-6, IL-8 y la citocina inmunosupresora IL-10.

- Provocan activación de LT muy débil.

Los niveles altos de β 2-m podrían contribuir a la progresión de la enfermedad a través de su efecto negativo sobre el sistema inmune.

Dado que la β 2-m es la cadena invariable de MHC-I, la presencia de niveles altos de β 2-m podrían afectar el balance y así la síntesis de β 2-m celular y la cadena alfa, así como también la expresión y estabilidad de moléculas MHC-I de superficie.

Se ha especulado que concentraciones altas de β 2-m envían una señal de retroalimentación negativa a las células para sintetizar menos β 2-m celular, lo cual resulta en un número reducido de MHC-I en retículo endoplásmico y muy pocas en superficie. β 2-m suprime la activación de la cascada de transducción de señal Raf/MEK/ERK, la cual es un mediador vital del número de destinos celulares que incluyen: crecimiento celular, proliferación, diferenciación y supervivencia (Gobin S. J. P. 2003).

P53

Cuando fue descubierta en 1979, la fosfoproteína p53 (peso molecular 53 KD) fue postulada por tener “un papel crucial en la modulación de la etapa transformada”. P53 es el gen más frecuentemente alterado en cánceres humanos, estando mutado en aproximadamente en 50% de todos los tumores humanos, la mayoría de éstas mutaciones son “sin sentido” y cambian la composición de un aminoácido de la proteína. Tales alteraciones pueden modificar la conformación y estabilidad de la proteína p53 y resultar en una modificación de la actividad transcripcional, así como también en incremento en la vida media de la proteína, permitiendo su detección mediante inmunohistoquímica (Foulkes W. D. 2007., Cordone I. 1998., Lens D. 1997).

El gen supresor de tumor p53, está localizado en el cromosoma 17p13.1, codifica para una fosfoproteína de 53 kd, la cual está normalmente en los núcleos de las células. La proteína tipo silvestre, tiene una vida corta y no puede ser detectada en el núcleo celular de la mayoría de los tejidos humanos normales. Su

nivel celular ésta regulado principalmente por la degradación mediante la vía ubiquitina-proteasoma. Este sistema consiste en la unión covalente de ubiquitina a proteínas, teniendo como objetivo su degradación y/o activación a través de procesos proteolíticos mediante un complejo multicatalítico, el proteasoma, que es un componente esencial de muchos procesos celulares, tales como: progresión del ciclo celular, regulación transcripcional y presentación de Ag. En contraste, p53 mutada tiene una vida media prolongada y se vuelve detectable mediante técnicas inmunológicas que usan Ab- monoclonales anti- p53 (figura 5) (Cordone I. 1998., Masdehors P. 2000).

La proteína p53 es un factor de transcripción el cual contiene un dominio de transactivación amino-terminal, un dominio de unión al DNA, un dominio de tetramerización carboxi-terminal y un dominio regulador. Cada dominio de p53 tiene un papel clave funcional, y mutaciones en la secuencia de aminoácidos puede alterar estas relaciones espaciales así como impactar en la naturaleza de los residuos de aminoácidos (Cho Y. 1994).

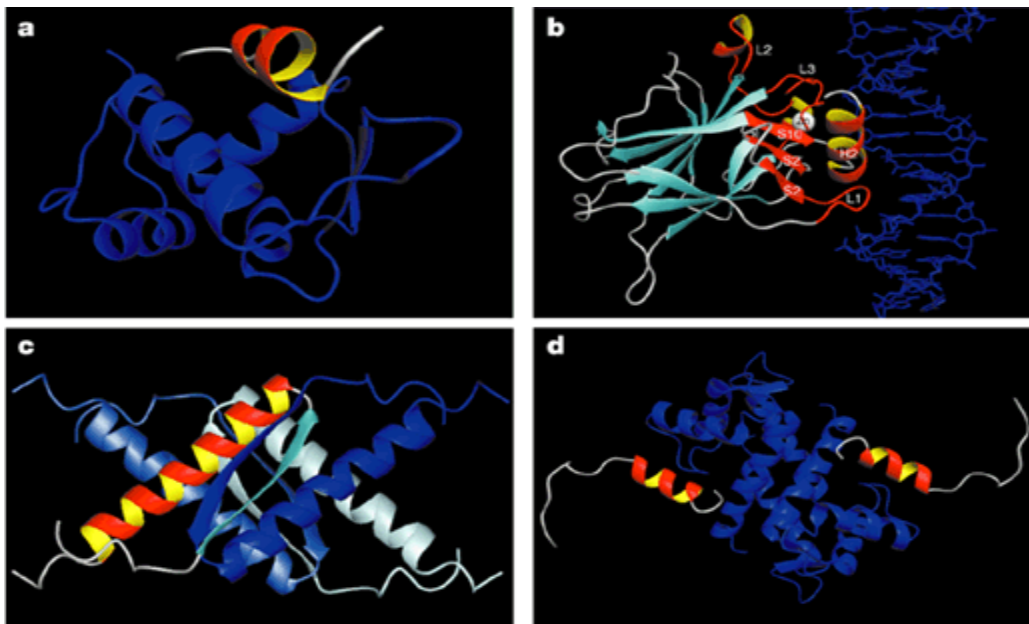


Figura 5. Estructura cristalina de p53. **a)** Estructura cristalina de un péptido del dominio amino terminal de transactivación de p53 que está unido al dominio amino terminal de MDM2. **b)** Estructura cristalina de un complejo DNA-dominio- p53 nuclear. La región de unión de DNA esta coloreada en rojo e incluye las asas 2 y 3 (L2,L3) y el asa-lamina-helice (LSH) motivo (L1, S2, S2', S10 y H2). **c)** Estructura del dominio de tetramerización de p53. **d)** espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) estructura de un péptido del dominio C-terminal de regulación negativa unido a S100B dimerica. Hélices de p53 están coloreadas en rojo y amarillo; tiras beta de p53 están coloreadas en cian y las asas están coloreadas en gris (Bullock A.N. 2001).

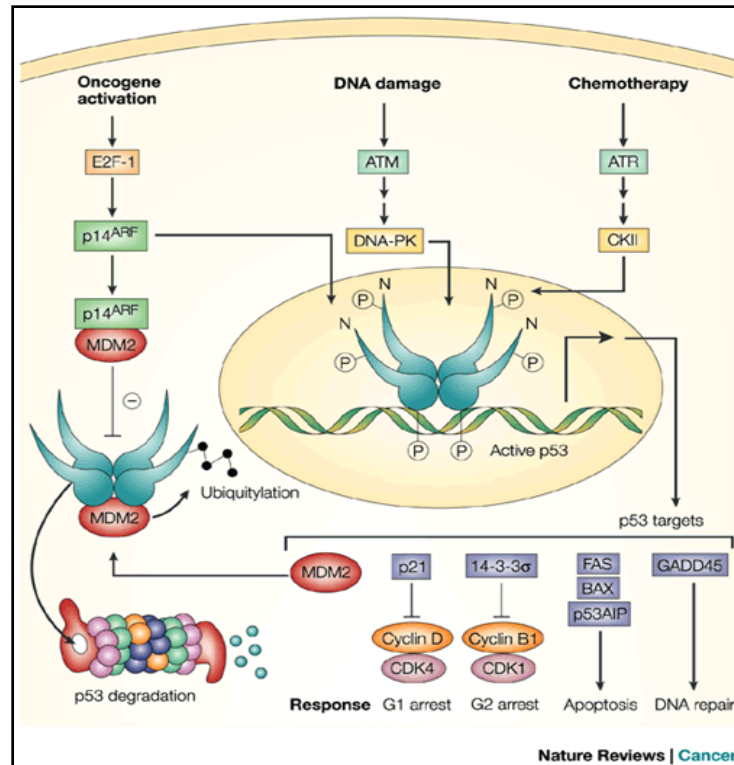


Figura 6. Un asa de realimentación regulatoria negativa controla los niveles celulares de p53. En células normales, la transcripción de p53 dependiente de MDM2 promueve la degradación de p53. El estrés celular, como la activación de un oncogen, se induce sobre p14^{ARF}, el cual secuestra a MDM2. Además, el daño del DNA y agentes quimioterapéuticos activan a las protein cinasas, como ATM y ATR, las cuales, a través de las protein cinasas dependientes de DNA (DNA-PK) y casein cinasa II(CKII), respectivamente, fosforilan el amino terminal de p53 para prevenir la unión de MDM2, y el carboxilo terminal de p53 incrementa la secuencia específica de unión al DNA. Estos eventos incrementan los niveles de p53 y activan la transcripción de los genes blanco de p53. p21 y 14-3-3 σ promueven la detención del crecimiento en los puntos de control del daño al DNA, G1 y G2, mediante la inhibición de la actividad de la protein cinasa dependiente de ciclina (CDK); FAS, BAX y p53AIP promueven la apoptosis si la reparación no es posible; y GADD45 promueve la reparación de DNA (Bullock A.N. 2001).

La proteína p53 funciona principalmente como un factor de transcripción multi blanco. Esto significa que controla la expresión de un amplio rango de genes con funciones varias. p53 es activado por el daño al DNA; sus funciones conocidas incluyen regulación del ciclo celular, senescencia, apoptosis, reparación de daño al DNA provocado por agentes genotóxicos, angiogénesis y regulación del estrés oxidativo (figura 8). Mediante la orquestación de la reparación o eliminación de células con daño en el DNA, mantiene la integridad del genoma y por lo tanto previene la expansión clonal. De ahí que se le haya acuñado el mote de “el guardian del genoma” (Lin K. 2002., Foulkes W.D. 2007., Cordone I. 1998).

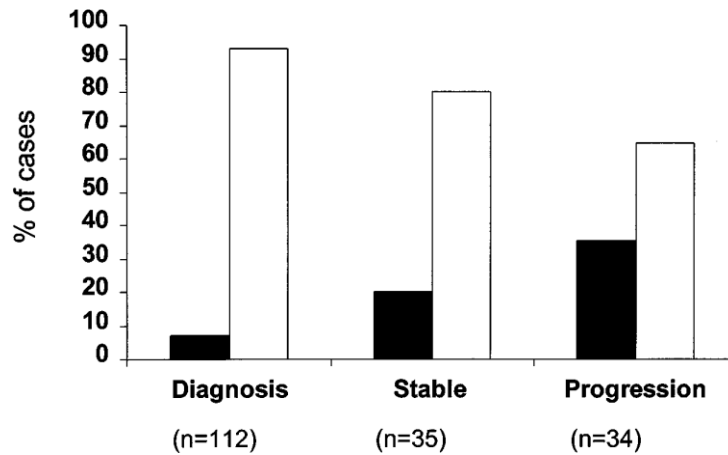


Figura 7. Porcentaje de pacientes con p53 positivo (barra negra) y p53 negativo (barra blanca) subdivididos de acuerdo a la fase de la enfermedad (Cordone I. 1998).

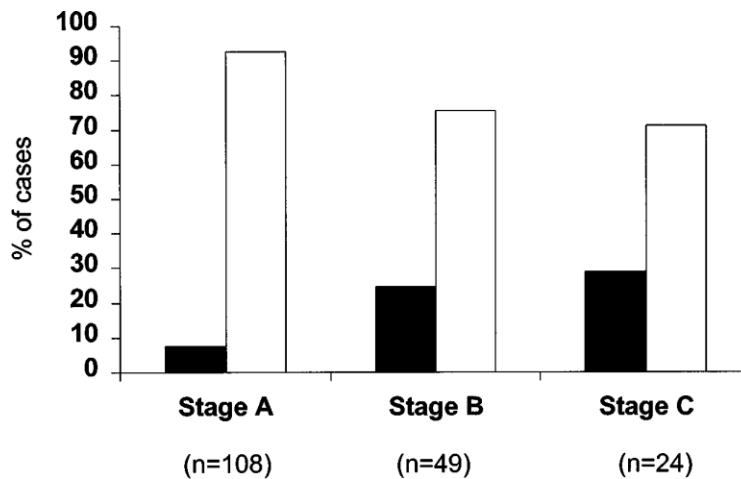


Figura 8. Porcentaje de pacientes con p53 positivo (barra negra) y pacientes p53 negativo (barra blanca) subdivididos de acuerdo al estado clínico (Cordone I. 1998).

La coexistencia de células p53 (+) y p53 (-) dentro de la misma población leucémica apoya la hipótesis de que la alteración de p53 puede ser un evento tardío en la progresión de la enfermedad. Aunque la alteración puede ocurrir de forma temprana en el transcurso de la enfermedad (Figuras 6 y 7) (Cordone I. 1998).

Se han demostrado dos tipos de disfunción de p53 en la LLC. Un defecto está asociado con la mutación del gen TP53 y otro con la inactivación del gen que codifica ATM, una cinasa que regula a p53 (Figura 9). Los pacientes con el defecto tipo A, asociado con mutación gen TP53 tienen supervivencia significativamente más corta que aquellos pacientes con el defecto tipo B, asociado con mutación ATM (38 meses contra 90 meses) (Lin K. 2002).

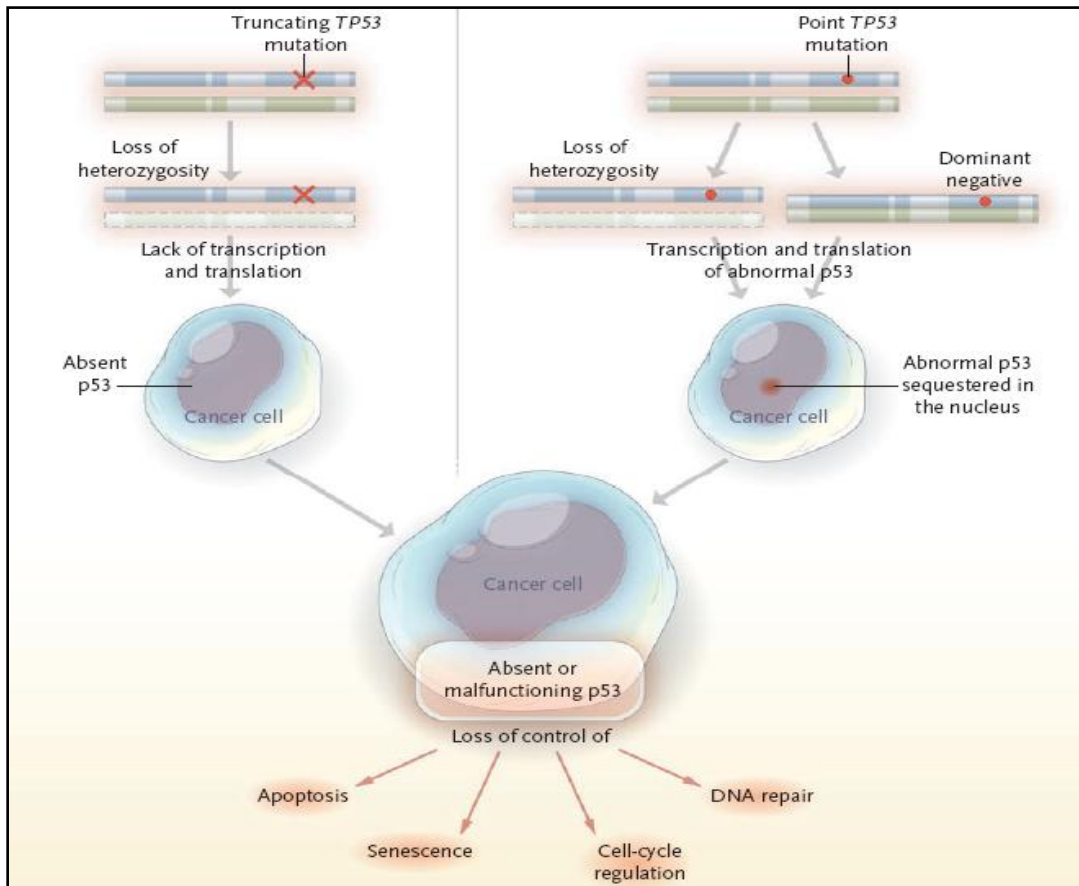


Figura 9. Efecto de mutaciones sobre el gen TP53 en el papel de p53 en procesos relacionados al cáncer (6).

También es congruente con el significado pronóstico adverso en LLC, las deleciones del cromosoma 17p13 y del cromosoma 11q22-23, las cuales involucran al gen p53 y al locus ATM respectivamente (Lin K. 2002).

En muchos casos la mutación de un alelo está asociada con la deleción de otro lo que lleva a la inactivación de ambos alelos normales. La mayoría de las

mutaciones de p53 están agrupadas en cuatro regiones de la proteína (residuos 117-142,171-181,234-258 y 270-286) (Figura 10) (Lens D. 1997).

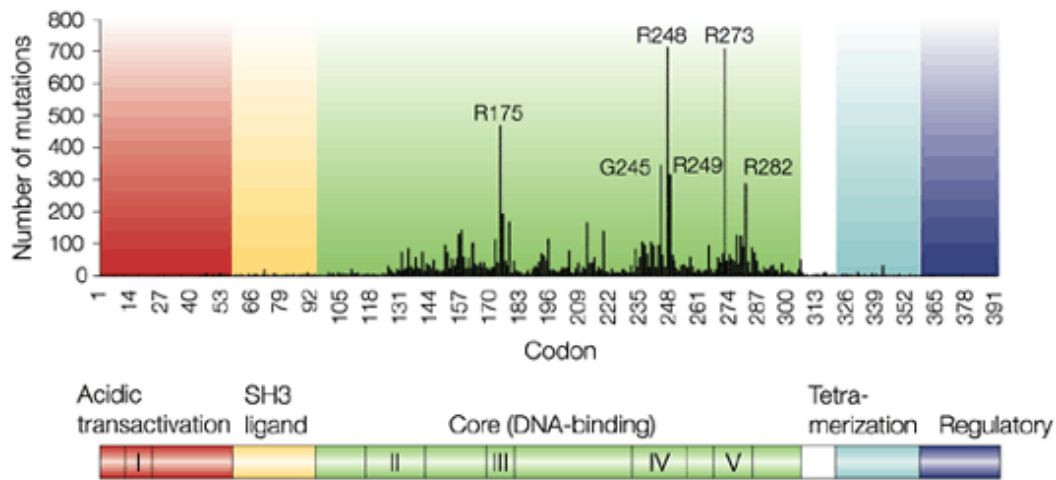


Figura 10. Histograma con las mutaciones más frecuentes sobre el gen p53. p53 es una proteína con 393 residuos que contiene un dominio amino terminal de transactivación, un ligando SH3 rico en prolina, un dominio central de unión al DNA, un dominio de tetramerización y un dominio carboxi-terminal regulatorio. Cinco cajas muestran las regiones de mayor conservación de secuencia; cuatro están en dominio central. Un histograma de mutaciones sin sentido en p53 que muestran 95% de mutaciones presentes en el dominio central; seis residuos marcados son los puntos calientes para mutación (Bullock A.N. 2001).

La pérdida del brazo corto del cromosoma 17 en el cual se localiza el gen supresor de tumores p53, no ha sido identificada como una aberración cromosómica frecuente (Dohner H. 1995).

Los pacientes con delección del gen p53, tienen supervivencia libre de tratamiento significativamente más corta, la respuesta a la terapia depende fuertemente de la presencia de delección de p53; aquellos pacientes con delección difícilmente responden, mientras los pacientes sin delección pueden lograr remisión. La supervivencia media después de iniciar la terapia en aquellos pacientes con delección del gen p53 fue de 7 meses (Dohner H. 1995).

La presencia de la delección del gen p53 tiene fuertes implicaciones para el curso clínico de la enfermedad. La supervivencia pobre podría ser asignada a la delección del gen p53 en lugar de la categoría de la enfermedad, ya que la delección del gen p53 tiene un valor predictivo igual de fuerte (Dohner H. 1995).

Las mutaciones de carácter homocigoto o aun heterocigoto del gen p53, pueden ser un mecanismo por el cual las células leucémicas se vuelven resistentes a terapia con análogos de purina, identificándolos en el subtipo de pacientes con resistencia a la terapia y pobre supervivencia (dohner H. 1995).

Después del daño al DNA, la vida media de p53 se vuelve prolongada y la proteína se acumula en el núcleo, donde como ya se mencionó se regula la transcripción de un número de genes (Pettitt A. R. 2001).

Las mutaciones del gen p53 típicamente prolongan la vida media de la proteína en ausencia de daño al DNA, y están además, asociadas con niveles basales aumentados. Sin embargo, aun cuando activados, la proteína p53 mutante no puede regular la expresión génica debido a su incapacidad para unirse a las secuencias específicas de DNA. La inactivación del gen ATM (ataxia telangiectasia mutado) es otra causa potencial de disfunción de p53 en la LLC. ATM es una proteína cinasa de alto peso molecular que es codificada en el cromosoma 11q22-23 que ha sido implicado en la activación de p53. Así, ATM puede asociarse con la fosforilación de p53 en la serina 15 y está involucrada en la defosforilación de p53 en la serina 376, ambos eventos están asociados con la activación de p53. Es probable que los defectos del gen ATM responsables por el daño de la activación de p53 en células de LLC resulte de la mutación o pérdida de ambos alelos (Pettitt A.R. 2001).

La expresión de p53 en LLC está fuertemente asociada con mutaciones del gen p53, una variante morfológica (LLC- PL), estado clínico avanzado, enfermedad progresiva, pobre respuesta a la terapia, supervivencia corta (Cordone I. 1998).

Con respecto a la asociación entre los genes IgV_H relativamente mutados y la disfunción de p53, hay algunas posibles explicaciones (Lin K. 2002):

- 1.- La disfunción de p53 podría dañar la capacidad de las células precursoras de LLC para someterse a hipermutación somática.

2.- Linfocitos de LLC con genes IgV_H relativamente mutados podrían ser más selectivos para la adquisición de cambios genéticos que resultan en la disfunción de p53.

3.- La disfunción de p53 podría facilitar la expansión clonal selectiva de células precursoras de LLC con genes IgV_H relativamente mutados.

4.- El fenotipo de las células tumorales con genes IgV_H extensamente mutados, podrían ser alterados en presencia de disfunción de p53, de tal forma que la enfermedad no se reconociera como LLC.

ZAP – 70

La fosforilación y defosforilación de las proteínas clave es un mecanismo que sutilmente regula las funciones celulares mediadas por fosfatasa y cinasas específicamente designadas.

Muchos de estos eventos toman lugar tempranamente después de que una célula recibe una señal externa, y recluta moléculas localizadas en la cercanía de la membrana celular.

Las cinasas de tirosina y las fosfatasa de tirosina, constituyen una vasta familia de reguladores cruciales del metabolismo celular; cerca de 500 genes de cinasas y 90 genes de fosfatasa han sido definidos.

Una de las clases principales de cinasas de tirosina es la familia Src. ZAP-70 pertenece a una familia de proteínas cinasas de tirosina (PTK) cercanamente relacionadas a Src, y es uno de los componente proximales de membrana asociado con la activación celular temprana en linfocitos T y células NK (Bene M. C. 2006).

ZAP-70 es una proteína de 70KD, codificada por un gen localizado sobre el cromosoma 2, en el locus 2q2 y está compuesta por 619 aminoácidos y tres dominios. Inicialmente fue identificada como compañero preferencial de la fosforilación de la cadena Z del complejo CD3 asociado al receptor de células

T(TCR) sobre los linfocitos T. Esto resultó en que se denominara proteína asociada a Z (Bene M. C. 2006).

Los dominios cinasa de tirosina son nombrados después de la estructura de cinasa Src, la cual contiene los tres dominios principales denominados SH por “Src Homology” (figura 11).

El dominio SH1, lleva a cabo la actividad enzimática, el dominio SH2 controla las interacciones proteína–proteína y la fosforilación mediante fosfotirosinas, y el dominio SH3 provee especificidad de reconocimiento extra en interacciones de proteínas (Bene M. C. 2006).



Figura 11. Estructura de ZAP-70 (20).

Los dominios SH2 de ZAP-70 reconocen específicamente a motivos de señalización presentes sobre receptores inmunes denominados ITAM, por sitios de activación basados en el inmunreceptor de tirosina. Los dominios SH2 interactúan con las tirosinas de estos motivos si ellos están fosforilados (Bene M. C. 2006).

El reconocimiento de un péptido antigénico por LT resulta en la activación y proliferación de linfocitos. Esto involucra uniones cruzadas de un gran número de TCR y sus moléculas asociadas en una sinapsis inmunológica (Bene M. C. 2006).

Dos tipos de proteínas transmembranales son importantes para ésta activación: el complejo CD3 y los co-receptores, ya sea CD4 o CD8, dependiendo del subtipo de LT reclutado en el reconocimiento (Bene M. C. 2006).

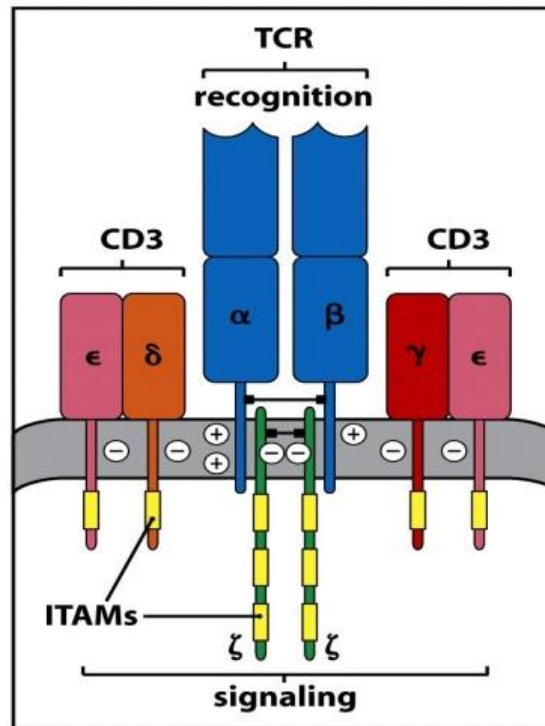


Figura 12. El complejo de receptor de células T está formado por proteínas de reconocimiento de antígenos y proteínas de señalización invariables. El heterodímero receptor de células T $\alpha:\beta$ (TCR) reconoce a su ligando péptido:MHC y se une a él, pero no puede emitir señales a la célula de que se ha unido al antígeno. En el complejo receptor funcional, los heterodímeros $\alpha:\beta$ se asocian con un complejo de otras cuatro cadenas de señalización (dos ϵ , una δ y una γ) llamadas en conjunto CD3, que se requieren para la expresión en la superficie celular de las cadenas de unión al antígeno y para la señalización. El complejo receptor de superficie celular también se asocia con un homodímero de cadena ζ que también contiene secuencias que también pueden emitir señales al interior de la célula en el momento de la unión al antígeno. Todas las cadenas contienen un motivo de señalización similar llamado un ITAM. Cada cadena CD3 tiene un ITAM (segmento amarillo), mientras que cada cadena ζ tiene tres. Las regiones transmembrana de cada cadena tienen carga positiva o negativa, como se muestra. Ahora se cree que una de las cargas positivas de la cadena alfa interactúa con las dos cargas negativas del dímero CD3 $\delta:\epsilon$, mientras que la otra carga positiva interactúa con el homodímero ζ . La carga positiva de la cadena beta interactúa con las cargas negativas en el dímero CD3 $\gamma:\epsilon$ (Kenneth M. 2009).

CD3 es un complejo multimolecular cercanamente asociado a TCR. Compuesto por 5 cadenas diferentes respectivamente nombradas γ , δ , ϵ , ζ y η . Todas las cadenas de CD3 llevan motivos ITAM los cuales son los responsables de la traducción de señal generada mediante el reclutamiento de el TCR con su ligando (Figura 12) (Bene M. C. 2006).

CD4 y CD8 proveen una señal coestimuladora que reconoce moléculas de MHC tipo II o tipo I las cuales están en las células presentadoras de antígeno. Esto es mediado por su asociación intracitoplásmica con la cinasa de linfocitos Lck (Bene M. C. 2006).

Poco después del compromiso de TCR, Lck es activada y su dominio de cinasa induce la fosforilación de los ITAMs de CD3, notablemente en la cadena z. Esto resulta en el reclutamiento de ZAP-70 citosólica la cual tiene alta especificidad para unirse a cadenas z fosforiladas; y de esta manera ZAP-70 se fosforila (Figura 13) (Bene M. C. 2006).

La cinasa ZAP-70 activa puede interactuar con las moléculas de la cascada de activación. El mayor sustrato de ZAP-70 activado es el ligando de células T activadas o LAT. LAT regula la activación de varias vías importantes que involucran al factor de crecimiento Grb2, fosfolipasa C, Ras, Vav (protooncogen) (Bene M. C. 2006).

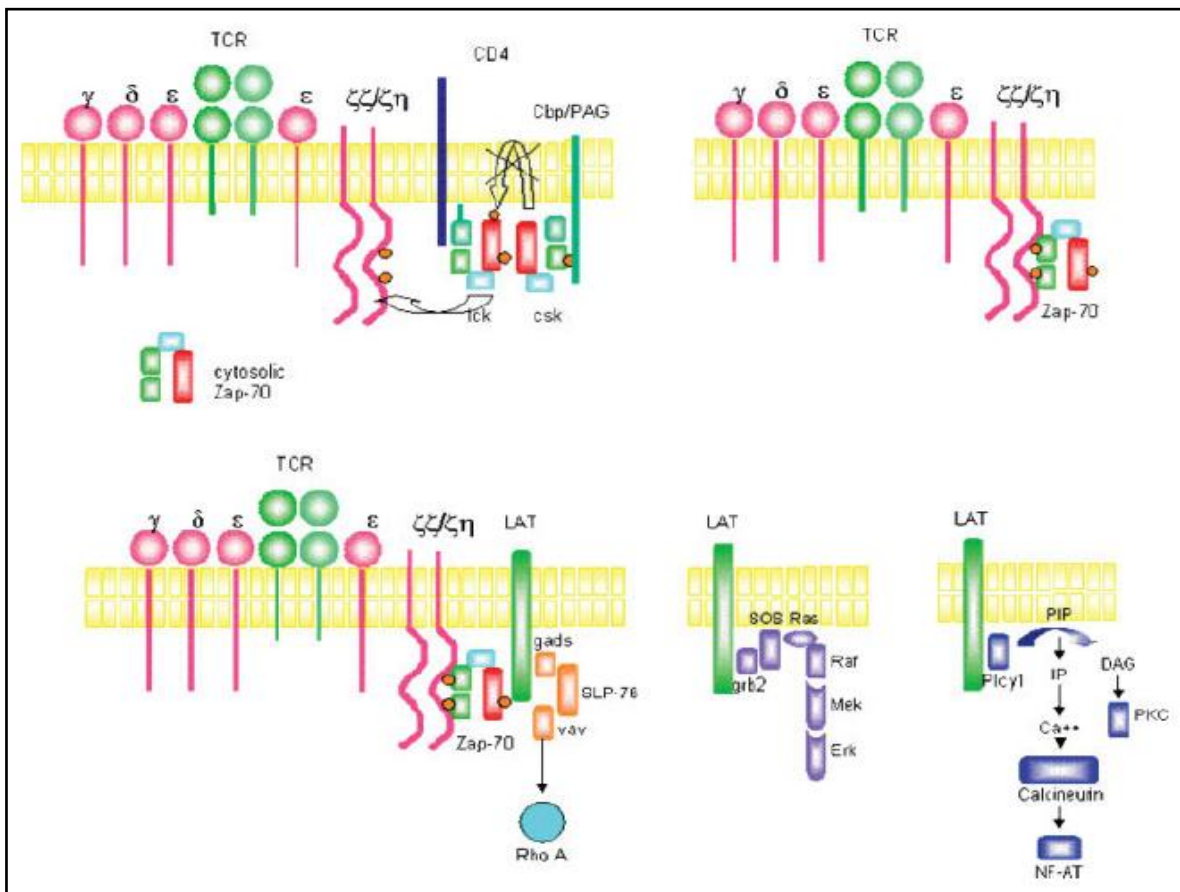


Figura 13. Participación de ZAP-70 en señalización del TCR. Panel superior: fosforilación de ZAP-70 mediante Lck. Lck es inactivado por csk. Remoción de un grupo fosfato en su tirosina terminal, Lck fosforila al ITAM sobre CD3. Esto permite el reclutamiento de ZAP-70 citosólica y su activación. Panel inferior: Señales de activación transducidas sobre la fosforilación de ZAP-70 (Bene M. C. 2006).

La mutación o ausencia de ZAP-70 resulta en una forma grave de inmunodeficiencia caracterizada por el déficit de LT CD8 en sangre periférica y disfunción de LT CD4, incapaces de transducir adecuadamente señales intracelulares (Bene M. C. 2006).

Las células B generalmente carecen de ZAP-70, de hecho para mediar la señalización del BCR utilizan una proteínkinasa relacionada llamada $p72^{Syk}$ (12). En los linfocitos B, la mayoría de las cascadas de activación de fosfotirosinas es llevada a cabo por $p72^{Syk}$, que es la cinasa homóloga de ZAP-70, pero ZAP-70 fue identificada en un subtipo de LB normales de bazo y amígdalas, pero no en sangre periférica. Se ha detectado expresión de ZAP-70 en algunas líneas celulares pro/pre B, pero no en células B maduras de sangre periférica. ZAP-70 y Syk son cruciales para el desarrollo y maduración de LT y LB respectivamente (Bene M. C. 2006).

La expresión de ZAP-70 en linfocitos B en la LLC correlaciona con el estado mutacional de los genes IgV_H en 93% de los pacientes. En LLC pudiera haber alteraciones de CD79b, y aunque normalmente actuaría Syk, la expresión de ZAP-70 resolvería el defecto (Bene M. C. 2006).

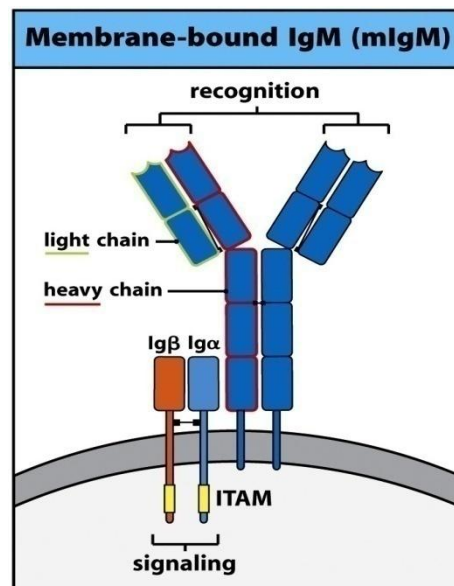


Figura 14. El complejo de receptor de células B (BCR). Está formado por una inmunoglobulina de superficie celular con una proteína invariable $Ig\alpha$ y una $Ig\beta$ (Dighiero G 2008., Bene M. C. 2006).

Diversos estudios han revelado que ZAP-70 está asociada con la señalización acrecentada de BCR (Figura 14) y que las mediciones de ésta proteína intracelular pueden ser usadas como marcador sustituto, ya que correlacione con el estado mutacional de los genes IgV_H para determinar la progresión de la enfermedad y la supervivencia en LLC (Bene M. C. 2006).

De hecho la señalización del Receptor de linfocitos B (BCR) es más eficiente en células ZAP-70 (+). La capacidad de ZAP-70 para facilitar y aumentar la señalización parece independiente de su actividad de cinasa, lo que indica que ésta proteína funciona más probablemente como una proteína adaptadora para facilitar la señalización de BCR en LLC (Chen L. 2008), y tal señalización intracelular aumentada podría influir en la supervivencia o proliferación de las células LLC. Alternadamente, la expresión de ZAP-70 en células de LLC puede aumentar la estabilidad de Syk fosforilada permitiendo la acumulación de la forma funcional de Syk en BCR en LLC (Chen L. 2008., Del Principe M. I. 2006).

La expresión de ZAP-70 es estable todo el tiempo, y su expresión en LB de LLC es el predictor más importante de la progresión de la enfermedad que la presencia de CD38 y CD23s. Se sugiere que ZAP-70 tiene un papel pronóstico superior sobre CD38 y el estado mutacional de IgV_H (Dighiero G. 2008., Bene M. C. 2006., Rassenti L. Z. 2006).

La expresión de ZAP-70 permite identificar pacientes con un curso clínico más agresivo, y además, tiene el potencial de ser un marcador molecular clínicamente útil de pronóstico de LLC. Las células de LLC que utilizan los genes IgV_H no mutados expresan RNAm de ZAP-70 (Wiestner A. 2003).

La expresión de RNAm de ZAP-70, es un excelente marcador sustituto para la distinción entre subtipos IgV_H mutado e IgV_H no mutado, siendo ZAP-70 (-) para el subtipo mutado y ZAP-70 (+) para el subtipo no mutado, esto permite identificar a grupos de pacientes con cursos clínicos divergentes (Figura 15, tablas 7 y 8). Aunque el mecanismo de relación entre la expresión de ZAP-70 y el estado mutacional de IgV_H es desconocido. Tanto la supervivencia libre de progresión

como supervivencia global son más cortas para pacientes ZAP-70 positivos, mientras que los pacientes ZAP-70 negativos logran una remisión más completa (10). Aquellos pacientes cuyas células leucémicas tuvieron expresión baja de ZAP-70, presentan enfermedad indolente con tiempo de tratamiento por más de 10 años (Crespo M. 2003).

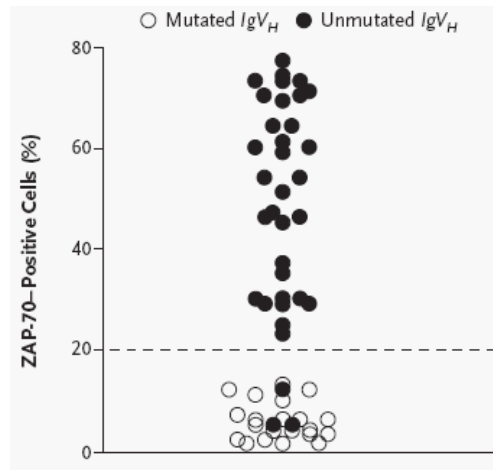


Figura 15. Correlación del nivel de la expresión de ZAP-70 y el estado mutacional de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgV_H) (Crespo M. 2003).

Tabla 7. Correlación entre el estado mutacional de los genes de IgV_H y la expresión de ZAP-70 en la LLC (Bosch F. 2006).

Study	N	Method	IgV _H	ZAP-70 <20%	ZAP-70 ≥20%	ZAP-70 negative	ZAP-70 positive
Crespo et al., 2003 (20)	140	Flow cytometry, Upstate, clone 2F3.2	Mutated	43%	7% ^a		
			Unmutated	5% ^a	45%		
Orchad et al., 2004 (25)	167	Flow cytometry, Upstate, clone 2F3.2	Mutated	65%	4% ^a		
			Unmutated	4% ^a	28%		
Rassenti et al., 2004 (26)	307	Flow cytometry, Becton Dickinson, clone 1E7.2	Mutated	37%	5% ^a		
			Unmutated	17% ^a	41%		
Krober et al., 2006 (27)	133	Flow cytometry, Upstate clone 2F3.2	Mutated	29%	11% ^a		
			Unmutated	14% ^a	46%		
Wiestner et al., 2003 (28)	107	DNA microarray	Mutated			70%	4% ^a
			Unmutated			23% ^a	3%
Laurenti et al., 2005 (29)	92	PCR (ZAP/Syk ratio)	Mutated			36%	28% ^a
			Unmutated			4% ^a	32%
Catherwood et al., 2006 (22)	42	RQ-PCR	Mutated			55%	5% ^a
			Unmutated			2% ^a	38% ^a

Tabla 8. Pronóstico y expresión de ZAP-70 en la LLC (Bosch F. 2006).

Study	N	Survival	ZAP-70 <20% (yr)	ZAP-70 ≥20% (yr)	P
Bosch et al., 2004 (30)	222	TTP ^a	Not reached	3.3	<0.001
		OS	16.3	8.5	<0.001
Orchad et al., 2004 (25)	167	OS	24.4	9.3	<0.0001
Rassenti et al., 2004 (26)	307	TTT	9.2	2.9	<0.0001
Krober et al., 2006 (27)	133	TFS	7.16	2.5	0.005
		OS	Not reached	8.5	0.004

^aTTP, time to progression; OS, overall survival; TTT, time to therapy; TFS, therapy-free survival.

Se ha sugerido que la expresión de ZAP-70 en LLC puede reflejar una etapa de activación de una clona maligna que está asociada con progresión de la enfermedad en algunos pacientes (Wiestner A. 2003).

Debido a que la expresión de ZAP-70 puede permitir asignar a la mayoría de los pacientes a un subtipo de mutación Ig correcto, la implementación de una prueba clínica que permita determinar la expresión de ZAP-70 sería una herramienta útil para ésta distinción (Wiestner A. 2003).

La expresión de ZAP-70 puede ser evaluada por Western blot, RT-PCR, inmunohistoquímica y citometría de flujo. La detección de ZAP-70 puede variar dependiendo del tipo de Ab's usados (Montserrat E. 2005., Sheikholeslami M. R. 2006).

CONCLUSIONES

- Diversos estudios han demostrado que niveles altos de beta2-microglobulina pueden dañar al sistema inmunológico y por consiguiente, contribuir a la progresión de la enfermedad.
- La determinación de ZAP-70 permite identificar y subdividir a los pacientes en dos subgrupos: uno de mal pronóstico (ZAP-70 positivo) y otro de buen pronóstico (ZAP-70 negativo).
- Estudios indican que ZAP-70 aparentemente participa en la señalización en células de LLC, interaccionando con el BCR.
- Durante los estudios realizados para determinar la expresión de ZAP-70, se observó que esta permaneció estable todo el tiempo del estudio, por lo tanto, esta propiedad es importante ya que puede predecir la progresión de la enfermedad.
- Mutaciones en p53 han sido encontradas en un porcentaje alto de pacientes con LLC, y esto ha sido relacionado con un mal pronóstico, así, como con la agresividad de la enfermedad.
- Algunos estudios han indicado que hay una regulación patológica del sistema de ubiquitinas que regula a p53, modificando así la respuesta apoptótica.
- La identificación de la delección del gen p53, caracteriza a un subgrupo de pacientes con resistencia a la terapia, pobre pronóstico y una supervivencia muy corta.

Bibliografía

1. - Xie Jin, Wang Ying, Freeman III E. Muta, Barlogie Bart, and Yi Qing. 2003. β 2-Microglobulin as a negative regulator of the immune system: high concentrations of the protein inhibit in vitro generation of functional dendritic cells. *Blood*. 101: 4005 - 2012.
- 2.- Gobin Sam J. P., Biesta Paula, and Van den Elsen Peter J.. 2003. Regulation of human β 2- microglobulin transactivation in hematopoietic cells. *Blood*. 101: 3058 – 3064.
3. - Dohner H., Fischer K., Bentz M., Hansen K., Benner A., Cabot G., Diehl D., Schlenk R., Coy J. and Stilgenbauer S. 1995. P53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 85: 1580 – 1589.
4. - Lin Ke, Sherrington Paul D., Dennis Michael, Matrai Zolta, Cawley John C. and Pettitt Andrew R. 2002. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgVH mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100: 1404 – 1409.
5. - Pettitt Andrew R., Sherrington Paul D., Stewart Grant, Cawley John C., A. Malcolm R. Taylor and Stankovic Tatjana. 2001. P53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation, *Blood*. 98: 814 – 822.
- 6.- Foulkes William D., M.B., Ph.D. 2007. p53 – Master and Commander. *N engl j med*. 357: 2539 – 2541.
- 7.- Cordone Iole, Masi Serena, Romana Mauro Francesca, Soddu Silvia, Morsilli Ornella, Valentini Tiziana, Vegna Maria Luce, Guglielmi Cesare, Mancini Francesca, Giuliacci Sonia, Saacchi Ada, Mandelli Franco and Foa Robert. 1998. P53 Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Marker of Disease Progression and Poor Prognosis. *Blood*. 91: 4342 – 4349.
- 8.- Masdehors Peggy, Merle – Beral Helene, Maloum Karim, Omura Satoshi, Magdelenat Henri, and Delic Jozo. 2000. Deregulation of the ubiquitin system and p53 proteolysis modify the apoptotic response in B-CLL lymphocytes. *Blood*. 96: 269 – 274.
- 9.- Lens Daniela, De Shouwer Pierre J.J.C., Hamoudi Rifat A., Abdul – Rauf Munah, Farahat Nahla, Matutes Estella, Crook Tim, Dyer Martin J.S. and Catovsky Daniel. 1997. P53 Abnormalities in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*. 89: 2015 – 2023.
- 10.- Wiestner Adrian, Rosenwald Andreas, Barry Todd S., Wright George, Davis R. Eric, Henrickson Sarah E., Zhao Hong, Ibbotson Rachel E., Orchard Jenny A., Davis Zandie, Stetler – Stevenson Maryalice, Raffeld Mark, Arthur Diane C., Marti Gerald E., Wilson Wyndham H., Hamblin Terry J., Oscier David G., and Staudt Louis M. 2003. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 101: 4944 – 4951.
- 11.- Crespo Marta, B.S., Bosch Francesc, M.D., Villamor Neus, M.D., Bellosillo Beatriz, Ph.D., Colomer Dolors, Ph.D., Rozman Maria, M.D., Marce Silvia, B.S., López-Guillermo

Armando, M.D., Campo Elies, M.D., and Montserrat Emili, M.D. 2003. ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N ENGL J MED*. 348: 1764 – 1775.

12.- Chen Liguang, Huynh Lang, Apgar John, Tang Li, Rassenti Laura, Weiss Arthur and Kipps Thomas J.. 2008. ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 111: 2685 – 2692.

13.- Chen Liguang, Widhopf George, Huynh Lang, Rassenti Laura, Rai Kanti R., Weiss Arthur, and Kipps Thomas J.. 2002. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 100: 4609 – 4614.

14.- Del Principe Maria Ilaria, Del Poeta Giovanni, Buccisano Francesco, Maurillo Luca, Venditti Adriano, Zucchetto Antonella, Marini Rita, Niscola Pasquale, Irno Consalvo Maria Antonietta, Mazzone Carla, Ottaviani Licia, Panetta Paola, Bruno Antonio, Bomben Ricardo, Suppo Giovanna, Degan Massimo, Gattei Valter, De Fabritiis Paolo, Cantonetti Maria, Lo Coco Francesco, Del Principe Domenico and Amadori Sergio. 2006. Clinical Significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 108: 853 – 861.

15.- Bullock Alex N. & Fersht Alan R.. 2001. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Canc*. 1: 68-76.

16.- Dighiero G, Hamblin T J. 2008. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 371: 1017–29.

17.- Montserrat E. Leucemia Linfática Crónica. 2005. En *Hematología Clínica*. Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons J.L. ELSEVIER. España. pp 491-500.

18.- Sheikholeslami M. R., Jilani I., Keating M., Uyeji J., Chen K., Kantarjian H., O'Brien S., Giles F., and Albitar M. 2006. Variations in the Detection of ZAP-70 in Chronic Lymphocytic leukemia: Comparison with IgVH Mutation Analysis. *ISAC*. 70B:270–275.

19.- Bosch Francesc, Muntañola Ana, Gine Eva, Carrio Ana, Villamor Neus, Moreno Carolina, Crespo Marta, and Montserrat Emili. 2006. Clinical Implications of ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *ISAC*. 70B:214–217.

20.- Bene Marie Christine. 2006. What is ZAP-70?. *ISAC*. 70B:204–208.

21.- Rassenti Laura Z. and Kipps Thomas J.. 2006. Clinical Utility of Assessing ZAP-70 and CD38 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *ISAC*. 70B:209–213.

22.- Kenneth Murphy. Reconocimiento de antígenos por receptores de células B y de células T. 2009. En *Inmunobiología de Janeway*. Murphy Kenneth, Travers Paul, Walport Mark. Mc Graw Hill. Mexico. pp 111-142.

23.- Bullock A.N, Fersht A.R. 2001. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Canc*. 1: 68-76.

24.- Faramarz Naeim. Mature B-Cell Neoplasms. 2008. En Hematopathology Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics and Molecular Approaches. Faramarz Naeim, M.D. P. Nagesh Rao, Ph.D. Wayne W. Grody, M.D. Ph.D. Elsevier. UK. pp 297-372.

25.- Montillo Marco, Hamblin Terry, Hallek Michael, Monserrat Emili, Morra Enrica. 2005. Chronic lymphocytic leukemia: novel pronostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*. 90: 391-399.

26.- Cho, Yunje.1994. Crystal Structure of a p53 Tumor Suppressor-DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations. *Science* 265 346-355.