

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

"CARACTERIZACION MOLECULAR DE PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS DE MEDULA OSEA DE PACIENTES CON
LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES"

ALUMNA: M. EN C. MÓNICA MADRIGAL VELÁZQUEZ

TUTOR DE TESIS
DR. HECTOR MAYANI VIVEROS

MEXICO D.F.

2005

INDICE



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	6
II. HEMATOPOYESIS	7
a. <i>Células Seminales Hematopoyéticas (CSH)</i>	10
b. <i>Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH)</i>	13
c. <i>Precursores Hematopoyéticos y Células circulantes</i>	15
d. <i>Microambiente Hematopoyético</i>	15
II. CELULAS LINFOIDES.....	16
a. <i>Linfocitos T y B</i>	16
b. <i>Linfopoyesis</i>	17
III. LINFOMAS.....	21
IV. LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES.....	26
a. <i>Marcadores moleculares del LDCG-B</i>	31
b. <i>Avances recientes en el estudio molecular del LDCG-B</i>	34
V. ANTECEDENTES.....	38
a. <i>LDCG-B: ¿Origen en médula ósea?</i>	38
b. <i>Hematopoyesis y LDCG-B</i>	41
VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	44
VII. OBJETIVOS.....	46
VIII. METODOLOGÍA.....	48
a. <i>Pacientes</i>	49
b. <i>Procesamiento de muestras</i>	49

1. Separación de poblaciones celulares de médula ósea -CD34+LIN- y CD34+CD38-LIN-.....	49
c. Inmunohistoquímica.....	52
d. RT-PCR Multiplex.....	52
e. Análisis Estadístico.....	53
IX. RESULTADOS	54
1. Características clínicas y hematológicas de los pacientes.....	54
2. Análisis del porcentaje de recuperación celular	56
3. Porcentaje de células progenitores hematopoyéticas CD34+.....	56
4. Análisis de la expresión genética en progenitores hematopoyéticos.....	61
5. Análisis de la expresión de proteínas en progenitores hematopoyéticos.....	74
X. DISCUSIÓN.....	81
XI. CONCLUSIONES	89
XII PERSPECTIVAS.....	90
XIII. BIBLIOGRAFIA.....	91
XIV. APENDICE.....	104

Artículos publicados:

- **Madrigal-Velázquez M**, Avilés-Miranda A, Mayani H. El linfoma difuso de células grandes: Nuevos enfoques moleculares. *Revista de Investigación Clínica* 2004; 56 (4): 483-494.
- **Madrigal-Velázquez M**, Avilés A, Neri N, Huerta J, Martínez-Jaramillo G, Mayani H. ICE, BCL-2, C-MYC, and P53 Expression in different Bone Marrow Cell Populations from Patients with Diffuse Large-B Cell Lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*. 2005.

RESUMEN

El estudio del Linfoma Difuso de Células Grandes (LDCG-B) a nivel de ganglios linfáticos ha sido llevado a niveles extremadamente finos y especializados, sin embargo hasta este momento no se sabe qué es lo que ocurre a nivel de las células hematopoyéticas de la médula ósea en esta patología. Así pues, el objetivo del presente trabajo fue estudiar a nivel molecular tres diferentes poblaciones celulares de médula ósea de pacientes con LDCG-B. Se analizaron tres poblaciones: células mononucleares, población compuesta predominantemente de células maduras (Población I); células CD34+LIN- (Población II) y células CD34+CD38-LIN- (Población III), ambas enriquecidas en progenitores hematopoyéticos primitivos, siendo la segunda más primitiva que la primera. En dichas poblaciones llevamos a cabo el análisis de la expresión de cuatro genes - ICE, C-MYC, BCL-2 y P53 -, los cuales son claves en procesos celulares como proliferación y apoptosis. Con base en nuestros resultados, nosotros podemos concluir que, contrario a lo que comúnmente se piensa, la médula ósea de estos pacientes no es completamente normal, sino que presenta diferencias sutiles en la expresión genética y de proteínas de dichas moléculas en células progenitoras hematopoyéticas. Es posible que las deficiencias en los potenciales de proliferación y expansión reportadas previamente en estos pacientes (Martínez-Jaramillo, 2004) pudieran ser explicadas por las alteraciones moleculares aquí detectadas. En este momento la identidad de la célula a partir de la cual se origina el linfoma es materia de controversia, por lo que no podemos descartar si los fenómenos observados en las diferentes poblaciones hematopoyéticas analizadas son las alteraciones primarias que dieron origen al linfoma o si son un reflejo de la enfermedad que se está desarrollando en ganglios linfáticos.

ABSTRACT

The study of Diffuse Large Cell Lymphoma-B (DLCL-B) at the lymph nodes has been taken to extremely fine and specialized levels, however what happens in this pathology at the level of hematopoietic cells from the bone marrow is not known at this moment. The objective of the present work was to study three different bone marrow cell populations from DLCL-B patients at the molecular level. Three populations were analyzed: mononuclear cells, composed mainly of mature cells (Population I); CD34+LIN- cells (Population II) and CD34+CD38-LIN- cells (Population III), both enriched in primitive hematopoietic progenitors, being the second population more primitive than the first one. In these cell populations we analyzed the expression of four genes – ICE, C-MYC, BCL-2 and P53 – which play key roles in cellular processes like proliferation and apoptosis. Based on our results, we can conclude that, on the contrary to the common thought, the bone marrow of these patients is not totally normal, but have subtle differences in gene and protein expression of these molecules in hematopoietic progenitors cells. It is possible that the previously reported deficiencies in the proliferation and expansion potentials in these patients (Martínez-Jaramillo, 2004) might be explained by the molecular changes detected here. At this moment the identity of the cell from which the lymphoma originates is a matter of controversy, therefore we can not exclude that the phenomema observed in the different hematopoietic populations we analyzed, are the primary alterations which give origin to the lymphoma or if they are a reflection of the disease that is developing in the lymph nodes.

I. INTRODUCCIÓN

Los linfomas constituyen un grupo heterogéneo de desórdenes hematológicos del linaje linfoide, considerados como neoplasias del sistema linfático. En la mayoría de los casos (60%), se desarrollan en los ganglios linfáticos, sin embargo, dado que la linfa circula a lo largo de todo el cuerpo, se pueden generar en otros sitios anatómicos (Stein H et al 2001). En base a la morfología celular que presente el tumor, los linfomas se clasifican en linfomas tipo Hodgkin (LH) y linfomas no Hodgkin (LNH). La incidencia de los LNH se ha incrementado dramáticamente en las últimas décadas; de ser un tipo de cáncer relativamente raro, ahora está dentro los primeros cinco tipos de cáncer más comunes en los Estados Unidos, reportándose una incidencia de 17.9/100,000 sujetos, para los hombres y de 11.5/100,000 sujetos, para las mujeres. Es superado solamente por el cáncer de próstata y el cáncer de mama (Cuneo y Castoldi, 2000).

De las variantes histológicas de linfoma, el *Linfoma Difuso de Células Grandes tipo B* (LDCG-B) es el más frecuente, representando del 38% al 78% del total de los linfomas. Lo anterior ha traído como consecuencia un gran interés en su estudio, tanto a nivel básico como clínico, con la finalidad de entender más a fondo la biología básica de la enfermedad, así como la evolución clínica del paciente.

II. HEMATOPOYESIS

El término hematopoyesis proviene de los vocablos griegos *haima* - sangre y *poiein* – hacer, que quiere decir formación de la sangre. En el humano la hematopoyesis embrionaria comienza en la estructura denominada aorta, gónada, mesonefro (AGM) junto con el saco vitelino; posteriormente continua en el hígado y en el bazo denominándose como hematopoyesis primitiva. Desde el sexto mes de desarrollo y durante toda la etapa pos-natal, hasta la muerte del organismo, la médula ósea se convierte en el principal órgano hematopoyético.

La hematopoyesis se divide en dos grandes ramas: la mielopoyesis y la linfopoyesis. A través del desarrollo de la mielopoyesis se forman los progenitores celulares responsables de la producción de eritrocitos, plaquetas, granulocitos (básofilos, eosinófilos y neutrófilos) y monocitos; mientras que a través de la linfopoyesis se forman los progenitores celulares que conducen a la generación de las diferentes clases de linfocitos (T, B y NK) (Figura 1).

Para el correcto desarrollo y funcionamiento de la hematopoyesis se requiere de la presencia de factores de crecimiento, en su mayoría citocinas y quimiocinas, encargadas de estimular o de inhibir la sobrevivencia y proliferación celular.

Las moléculas de adhesión y sus receptores juegan un papel crucial en el correcto funcionamiento del sistema hematopoyético ya que no sólo se encargan de mediar las interacciones célula-célula y célula-matriz, sino que también son capaces de regular la diferenciación celular. Entre estas moléculas se encuentran las selectinas y las integrinas, así como moléculas de la familia de las inmunoglobulinas (Tabla 1) (Quesenberry JP y Colvin AG, 2001, Abboud NC y Lichtman AM, 2001).

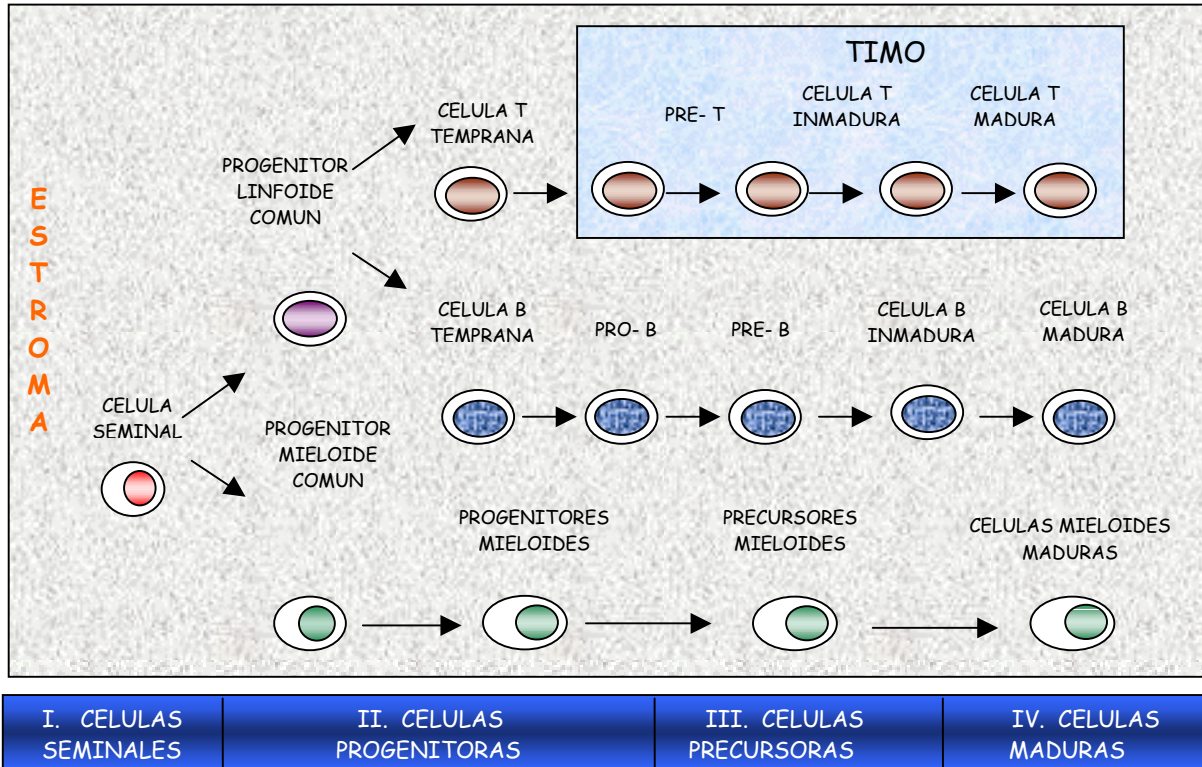


Figura 1. Compartimentos del sistema hematopoyético.- El sistema hematopoyético esta constituido por 4 compartimentos principales I. Células seminales, II. Células progenitoras, III. Células precursoras y IV. Células maduras circulantes. Todos ellos interactúan de manera directa con los componentes del microambiente hematopoyético.

**TABLA 1. RECEPTORES Y LIGANDOS PRESENTES EN
CELULAS SEMINALES Y CELULAS
PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS**

LIGANDO	RECEPTOR
VCAM	VLA-4
Fibronectina	VLA-5
Laminina	VLA-6
Glicosaminoglicanos	PECAM
Lewis X1 Sialil	L-selectina
CD34	E-selectina
Acido hialurónico, colágeno, adreínas	CD44

Tomado de Quesenberry JP y Colvin AG, 2001

Para su estudio el Sistema Hematopoyético ha sido dividido en cuatro compartimentos, los cuales serán descritos a continuación:

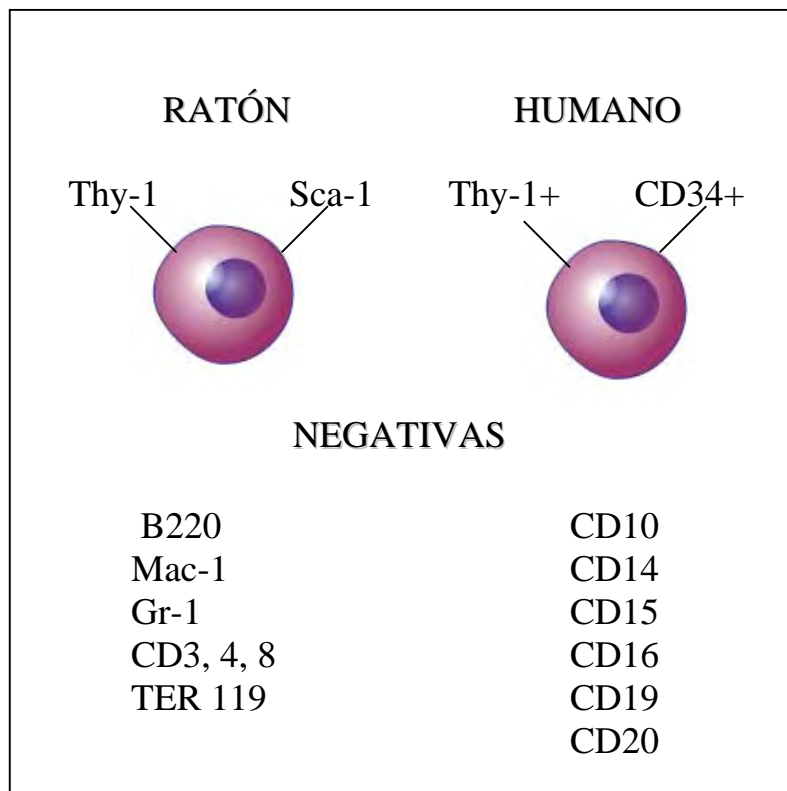
a. *Células Seminales Hematopoyéticas (CSH)*

Para que se lleve a cabo el proceso hematopoyético se requiere la participación de células especializadas, denominadas células seminales hematopoyéticas (CSH), las cuales corresponden al primer compartimento celular hematopoyético. Para que una célula sea considerada como CSH debe de cubrir tres características principales: la primera de ellas es que sea multipotente, es decir que tenga la capacidad de generar, al menos, los ocho linajes hematopoyéticos (linfocitos B y T, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, basófilos/células cebadas, eosinófilos, neutrófilos/granulocitos, y monocitos/macrófagos); la segunda es que posea un alto potencial de proliferación; y la tercera es que mantenga la capacidad de auto-renovación (generar células hijas con características idénticas (Szilvassy, 2003). Las CSH tienen la característica particular de encontrarse principalmente en los estadios G₀/G₁ del ciclo celular, es decir en estado de quiescencia, lo que las hace resistentes al tratamiento con fluorouracil o 4-HC (4-hidroperoxiciclosfosfamida), con los cuales es fácil separarlas de las células en división sin afectar la habilidad de repoblar a largo plazo la médula ósea.

Las CSH no pueden ser reconocidas morfológicamente por lo que es necesaria la identificación de los antígenos de superficie que presentan (Mayani H, 1999). De ahí que las CSH fueron inicialmente clasificadas en base a la presencia de la sialomucina CD34 en su superficie celular (Mayani H, 1989, Bhatia M, 1998), así como en su capacidad de restablecer la hematopoyesis en ratones que habían sido previamente irradiados (Spangrude GJ, 1988). La población de células CD34⁺ se puede dividir de acuerdo a la expresión de

diferentes antígenos de superficie. Así, se sabe que las CSH carecen de antígenos presentes en células maduras de diferentes linajes (LIN-), *no* expresan CD45RA (Landsorp PM, 1990), CD38 (Terstappen LWMM, 1991) ni CD33 (Ogawa, 1993) pero sí expresan Thy-1 o CD 90 (Baum CM, 1992 y Craig, 1993), y CD45RO, c-Kit, Flk-2/Flt-3 y AC133 (Watt SM y Viseer JW). Las principales diferencias inmunofenotípicas entre las CSH de ratón y humano se muestran en la Figura 2.

**FIGURA 2. ANTÍGENOS DE SUPERFICIE EN CELULAS SEMINALES
HEMATOPOYÉTICAS DE HUMANO Y RATÓN**



Tomado de Akashi K y Weissman LI, 2001.

b. Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH)

Las CPH conforman el segundo compartimento hematopoyético, estas células han perdido la capacidad de auto renovarse y son generadas como resultado de la diferenciación de las CSH. Dentro de la población de células CD34+ se puede encontrar una gran proporción de células progenitoras hematopoyéticas, las cuales tienen la capacidad de formar colonias en cultivos semisólidos dado que poseen una gran capacidad proliferativa, sin embargo no son capaces de mantener la hematopoyesis en estos mismos cultivos, ni de restablecer la hematopoyesis *in vivo* (Szilvassy JS, 2003) (Figura 1). Este tipo particular de células comienza a expresar marcadores específicos de linaje como por ejemplo el progenitor común para células linfoides expresa CD34 y CD10 y el progenitor común para células mieloides expresa CD34 y CD33. Para este grupo de células en particular se pueden tener progenitores unipotentes, es decir que tiene la capacidad de dar origen a un solo tipo celular, o del tipo bipotentes o tripotentes, para generar dos o tres linajes celulares diferentes. En la Tabla 2 se muestran las principales diferencias entre las CSH y las células progenitoras (Quesenberry JP y Colvin AG, 2001).

TABLA 2. PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE CÉLULAS SEMINALES Y CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

CARACTERISTICA	CSH	CPH
1. Potencial proliferativo	Alto	Más limitado
2. Autorenovación	Sí	No
3. Potencial de diferenciación	Todos los linajes linfohematopoyeticos	Restringido
4. Ciclo celular	Quiescente	Activo
5. Requerimiento de citocinas	Gran cantidad para mantener el fenotipo	Restringido
6. Origen celular	Desconocido	CSH
7. Tinción con Rodamina & Hoechst	Tenue	Fuerte
8. Hematopoyesis a largo plazo (<i>in vivo</i>)	Sí	Limitada
9. Adherencia al estroma medular	Sí	Variable

Modificado de Quesenberry JP y Colvin AG, 2001. CSH.- Célula Seminal Hematopoyética, CPH.- Célula Progenitora Hematopoyetica.

c. Precursores Hematopoyéticos y Células circulantes

El tercer compartimento está formado por las *células precursoras*, las cuales ya son reconocibles por su morfología celular y expresan en su superficie los antígenos característicos de cada linaje en particular; estas últimas dan origen directamente al cuarto compartimento formado por las *células maduras* circulantes (Mayani, 1999) (Figura 1).

d. Microambiente Hematopoyético

Para el correcto desarrollo y funcionamiento del sistema hematopoyético es necesaria la presencia del microambiente hematopoyético, el cual es una estructura tridimensional compleja altamente organizada, que regula la localización y fisiología de las células hematopoyéticas. Dicho microambiente consiste en células del estroma como macrófagos, adipocitos y fibroblastos, además de células accesorias y sus productos (matriz extracelular y citocinas) (Mayani, 1992, Perkin S, 1998).

II. LAS CÉLULAS LINFOIDES

a. Linfocitos T y B

Los *linfocitos* son las células efectoras del sistema inmune, ya que son las células responsables de reconocer, responder y eliminar de manera específica a sustancias extrañas o ajenas al organismo. Pueden ser claramente distinguidos de las células no linfoides por su morfología, aunque recientemente se utiliza el marcador de superficie CD3 para poder diferenciarlos de células que no pertenecen a esta estirpe.

Los *linfocitos T* son los responsables de controlar la inmunidad mediada por células y corresponden entre el 65-85% de la población de linfocitos circulantes. En base a sus funciones efectoras han sido divididos en dos grupos: los *linfocitos T cooperadores*, que expresan en su superficie el antígeno CD4, y los *linfocitos T citotóxicos*, que expresan el antígeno CD8. Los linfocitos CD4 a su vez se pueden dividir en linfocitos T CD4 Th1 y Th2, esto en base a funciones particulares de cada célula y a su capacidad para producir tipos específicos de citocinas. Tanto los linfocitos CD4 como los CD8 son capaces de reconocer antígenos a través de receptores en su superficie, denominados receptores de células T o TCR.

Los *linfocitos B* son los responsables de la inmunidad humoral y comprenden entre el 5-15% de los linfocitos circulantes. También son capaces de reconocer antígenos por medio del receptor de células B o BCR, pero a diferencia de los linfocitos T son las únicas células capaces de producir anticuerpos y de expresarlos en su superficie. Las células B especializadas en la producción de anticuerpos son conocidas como *células plasmáticas*. Estas, pueden especializarse aun más y generar *células B de memoria*, las cuales tienen la capacidad de responder de manera rápida y eficiente en encuentros subsecuentes con los antígenos que las activaron por primera vez.

Durante su maduración y diferenciación, los linfocitos atraviesan por una serie de mecanismos denominados recombinación somática e hipermutación somática, con la finalidad de que se produzcan receptores de antígenos eficientes (TCR y BCR) que sólo reconozcan lo extraño y no lo propio, y por lo tanto, que sean activados eficientemente. En el caso de las células B, además de los procesos anteriores, requieren de procesos como la generación de diversidad y la elección del anticuerpo que se va a producir. Todos estos mecanismos se llevan a cabo a través de una serie de pasos que ocurren durante la linfopoyesis (generación de células linfoides). Si ocurren fallas durante este proceso, la mayoría de las veces los linfocitos estarán destinados a morir (LeBien T, 1997).

b. Linfopoyesis

La linfopoyesis es el mecanismo por el cual se forman los linfocitos y por el cual las células linfoides atravesarán por diferentes estadios de diferenciación y maduración. A partir de la CSH se genera *el progenitor linfoide común* (PLC), el cual es capaz de dar origen a linfocitos T, B y NK y células dendríticas, pero no a células mieloides. Dicha célula se caracteriza por la presencia de los antígenos de superficie CD34, CD10, CD45RA (Galy, 1995) y CXCR4 (Ishii, 1999).

A partir del PLC es que ocurre la separación dentro de la línea linfoide, tanto para el linaje de células B, como de células T. Mientras que el *progenitor de células B* (PLB) permanece en la médula ósea y expresa los antígenos CD34, CD38, CD10 y CD19 (Loken, 1987), el *progenitor de células T* (PLT) sale de la médula ósea para migrar al timo, en donde continua y finaliza su maduración; dicho progenitor expresa los antígenos CD34, CD38, CD10 y CD7 (Spits, 1998). Estos progenitores para su desarrollo y proliferación requieren de la interacción con los elementos del estroma de la médula ósea y con citocinas como la IL-7, stem cell factor (SCF), e IL-3.

Una vez que se han formado los progenitores linfoides (PLB y PLT), procede la generación de los precursores linfoides, en este momento aun se discute la existencia de algún precursor común para linfocitos T y B. Durante el paso de progenitor a precursor, tanto de células B como de células T, sufren los procesos de recombinación somática para los genes V (variables), D (diversidad), J (unión), correspondientes a los receptores de antígeno y para los genes de inmunoglobulinas (esto sólo en células B), que servirán para la generación del repertorio de células T y B que el organismo necesita. Posteriormente, se pasa al estadio de linfocitos B inmaduros, que presentan inmunoglobulina M en su superficie, mientras que los linfocitos T ya presentan su TCR particular completamente formado y empiezan a expresar los antígenos de superficie CD4 y CD8. Cuando los linfocitos B presentan su receptor de antígeno en la superficie, además de IgM e IgD, están listas para abandonar la médula ósea, como células *naive* o que no han tenido contacto con antígenos. Los linfocitos T estarán maduros cuando tengan definido en su superficie el antígeno CD4 o el CD8 y el receptor para antígeno completo; en este momento podrán abandonar el timo y junto con los linfocitos B migrar hacia la circulación y poblar los órganos linfoides secundarios, listos para montar respuestas inmunes (Figura 1 y 3) (LeBien, 1997).

Dentro de la médula ósea se forman progenitores hematopoyéticos linfoides, tanto de tipo B como de tipo T, sin embargo, estas células difieren en cuanto al sitio anatómico en el cual terminan su maduración. Mientras que los progenitores de linfocitos T migran al timo, los progenitores de linfocitos B completan este proceso dentro de la médula ósea. Cuando ambos tipos de linfocitos completan su maduración, migran hacia órganos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos, las amígdalas y tejido linfoide asociado a mucosas (Figura 1 y 3) (LeBien, 1997, LeBien 2000).

Los ganglios linfáticos no constituyen órganos linfopoyéticos, pero se les considera como órganos linfoides secundarios que forman parte del sistema linfático. Serán

descritos ya que, como se verá más adelante, son los principales sitios anatómicos en donde se generan los linfomas. La función principal de estos órganos es la de actuar como filtros a medida que la linfa circula a través del cuerpo. Están constituidos principalmente por linfocitos T y B y se distribuyen en las axilas, cuello, ingles, pecho, abdomen, etc.

Su estructura general consiste de corteza, cápsula, folículos, centros germinales, corteza parafolicular, sinusoides, así como venas linfáticas aferentes y eferentes. La corteza está formada por folículos, los cuales son estructuras esféricas organizadas por linfocitos B vírgenes, que no han tenido contacto con antígenos, denominados folículos primarios. Cuando estas células son estimuladas comienzan a proliferar y forman los centros germinales, los cuales se encuentran rodeados por otro tipo de linfocitos más pequeños que forman la zona del manto. A este conjunto de células se les denomina folículo secundario. La para-corteza es la región en la que se encuentran linfocitos T y células dendríticas listas para estimular a los linfocitos B a través de los mecanismos de presentación de antígenos. En la médula, se encuentran los sinusoides linfoides formados básicamente por linfocitos y macrófagos; también se encuentran los cordones medulares, formados por células plasmáticas.

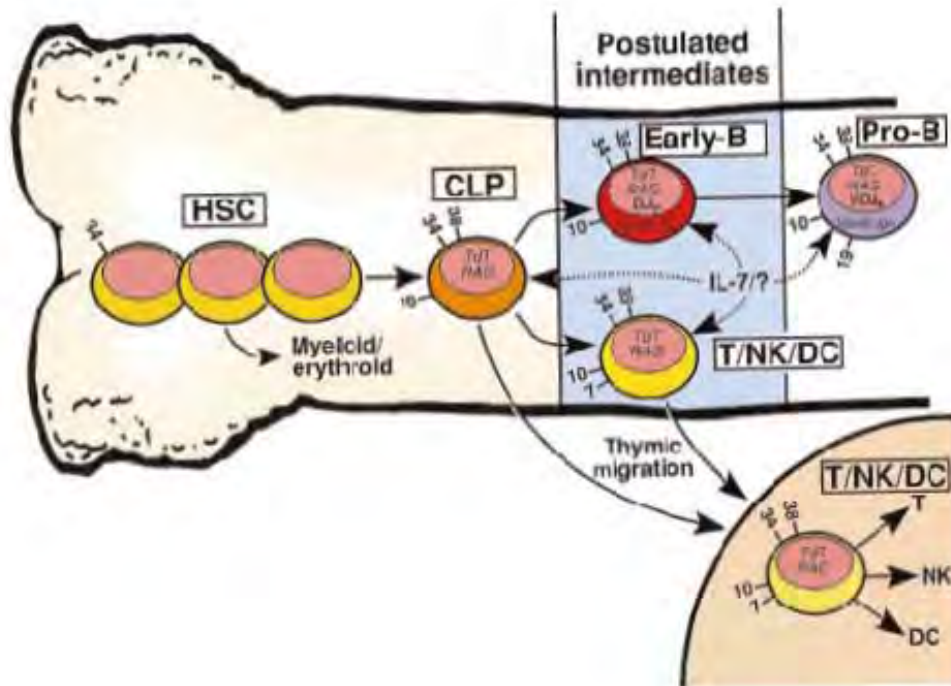


Figura 3. Linfopoyesis.- Las Células Seminales Hematopoyéticas (CSH) dan origen a los Progenitores Linfoides Comunes (PLC) presentes en la médula ósea, los cuales son capaces de generar los diferentes tipos de linfocitos T, B, NK y células dendríticas. Tomado de LeBien, 2000.

III. LINFOMAS

El término linfoma se utiliza para denominar a las neoplasias que se desarrollan en el sistema linfático. Es precisamente en las células de este sistema en donde se generan los denominados Linfomas no Hodgkin (LNH) y los Linfomas tipo Hodgkin (LH). Los LH se diferencian de los LNH en base a un tipo celular particular que los forma, denominado células Reed-Sternberg. A diferencia de los LNH los LH surgen en un sólo ganglio y se propagan característicamente a los ganglios de la vecindad (Cotran, 2001).

Como toda enfermedad clonal, los linfomas se derivan de una sola célula que ha sufrido una transformación maligna. Los LNH tienen características semejantes a la célula de la cual se originaron, por lo que su diagnóstico y clasificación resultan complicados debido a que provienen de células linfoides normales, las cuales atraviesan por una gran variedad de estadios morfológicos durante su desarrollo y diferenciación. Así pues, los LNH pueden originarse en cualquier punto durante dicho proceso de maduración. La mayoría de los LNH se derivan de linfocitos B, menos del 10% son derivados de células T y una porción similar no presenta marcadores para ninguno de los dos linajes (Harris, 1994, Hiddeman, 1996).

Algunos de los factores de riesgo asociados a los LNH son la edad y el sexo; de hecho, la probabilidad de desarrollar esta enfermedad aumenta con la edad y es mayor en hombres que en mujeres. También la historia familiar de enfermedad es un factor muy importante, ya que incrementa el riesgo de padecer linfoma en unas 3 ó 4 veces. Los linfomas son más comunes en personas con inmunodeficiencias hereditarias, como en la ataxia-telangiectasia, agamaglobulinemia de Bruton, inmunodeficiencia severa combinada, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de Duncan y síndrome Chediak-Higashi. Los desórdenes autoinmunes como artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y el lupus eritematoso sistémico resultan factores de riesgo para el desarrollo de LNH. Los agentes

infecciosos como el virus Epstein-Barr, el virus de la hepatitis C, el virus de la leucemia humana de células T tipo 1 (HTLV-1), el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH), así como la infección con *Helicobacter pylori*, son factores de riesgo importantes que incrementan las posibilidades para desarrollar LNH. Los factores ambientales como la exposición a pesticidas, herbicidas, solventes y fertilizantes, también son factores de riesgo para el desarrollo de linfomas (Greiner, 1995).

La clasificación clínica de los linfomas ha sufrido cambios. Inicialmente se utilizó la clasificación de Ann Arbor, la cual divide en cuatro etapas a los LNH de acuerdo a su localización, siendo la *Etapa I* cuando el tumor se encuentra en un solo sitio anatómico, ya sea ganglionar o en cualquier otra parte del cuerpo, *Etapa II* si el tumor se encuentra en dos o más sitios anatómicos del mismo lado del cuerpo, *Etapa III* cuando existe una cantidad indeterminada de tumores en ambos lados del cuerpo, pero no afectan la MO ni el sistema nervioso central. Finalmente la *Etapa IV*, cuando el tumor ha afectado la MO o el sistema nervioso central.

El Índice Internacional de Factores Pronósticos (IPI) propone como factores adversos aplicables a los LNH: edad de 60 años, etapas III y IV, que se encuentre involucrado más de un sitio extraganglionar y niveles de deshidrogenasa láctica (DHL) mayores de lo normal. En base a este índice se pueden estratificar grupos de riesgo en base al número de factores adversos del IPI que presente un paciente en particular, de tal forma que un índice de 0-1 indica riesgo bajo o buen pronóstico; índice de 2 indica riesgo bajo-intermedio de mal pronóstico; índice de 3 indica riesgo alto-intermedio de mal pronóstico; índice de 4-5 indica riesgo alto de baja sobrevivencia (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project 1993).

El tratamiento de los LNH es muy específico para cada variante, y viene determinado por su estadio, grado, tipo histológico y el IPI. El tratamiento se basa

fundamentalmente en quimioterapia con diversos citotóxicos (Gordon, 1992). Cuando las dosis de éstos se incrementan, se requiere el uso de factores estimuladores de colonias (Avilés, 1995). También se utilizan tratamientos con interferón α (Smalley, 1992, Avilés, 1992) así como tratamientos con trasplante de células hematopoyéticas (Haouin, 1994).

La clasificación histológica de los linfomas ha sido modificada varias veces. La primera clasificación fue la de Liag y Mallury en 1941, siendo modificada por Rappaport en 1966; seguida por la clasificación de Kiel, (Stansfeld, 1988) y Lukes y Collins (Lukes y Collins, 1974). En 1982 se publicó la Formulación de Trabajo la cual fue ampliamente utilizada. Dicha clasificación menciona que los linfomas se derivan de células B o T/NK e incluye nuevos subtipos que antes no se consideraban. Esta resultó ser una clasificación sencilla para su utilización en la práctica clínica, ya que se basa predominantemente en el patrón de crecimiento celular pero sobre todo en su evolución clínica con tres etapas de riesgo: alto, intermedio y bajo. La Revisión Europeo-Americana del Linfoma (REAL), desarrollada en 1994, fue el primer intento de tener una clasificación clínico-patológica (Tabla 3). (Harris, 1994, Harris, 1995). Esta clasificación fue validada a través de un estudio multi-institucional. Dicho estudio mostró que la clasificación REAL no sólo es reproducible sino clínicamente relevante. En 2001 se publicó una nueva clasificación de los tumores linfoides y hematopoyéticos auspiciada por la Organización Mundial de la Salud. Básicamente es una actualización de la clasificación REAL con cambios menores, ahora agrupando a los LNH en: poco agresivos, agresivos y altamente agresivos (Chan, 2001).

Es importante resaltar que aún cuando la lista de los LNH es muy larga, en la práctica clínica solamente 6 entidades cubren cerca del 80% de todos los linfomas en adultos (Tabla 4). Para los casos de LNH en niños, 3 entidades son las que cubren la mayoría de los casos (Tabla 5). (Chan, 2001). Como se puede observar, tanto en adultos como en niños el LDCG-B ocupa un lugar importante.

TABLA 3

CLASIFICACION DE LOS LINFOMAS NO HODGKIN

NEOPLASIAS DE CELULAS B
I. NEOPLASIAS DE PRECURSORES DE CELULAS B Linfoma /Leucemia linfoblástica
II. NEOPLASIAS DE CELULAS B PERIFERICAS Leucemia linfocítica crónica de células B Linfoma linfoplasmacitoide Linfoma de células del manto Linfoma de centro folicular (grado I, grado II y grado III) Linfoma de la zona marginal Linfoma esplénico de la zona marginal (entidad provisional) Leucemia de células vellosas Plasmacitoma/Mieloma <i>Linfoma difuso de células grandes</i> Linfoma de Burkitt Linfoma parecido al de Burkitt
NEOPLASIAS DE CELULAS T
I. NEOPLASIAS DE PRECURSORES DE CELULAS T Linfoma/Leucemia linfoblástica
II. NEOPLASIAS DE CELULAS T Y CELULAS NK Linfoma linfocítico crónico/Leucemia prolinfocítica Leucemia linfocítica granular (tipo T y tipo NK) Micosis fungoide/Síndrome de Sezary Linfoma periférico de células T Linfoma angioinmunoblástico Linfoma angiocéntrico Linfoma intestinal Linfoma/Leucemia de células T adultas Linfoma anaplásico de células grandes

Modificado de Harris, 1994.

TABLA 4
LNH MÁS COMUNES EN ADULTOS

1. Linfoma difuso de células grandes tipo B	31%
2. Linfoma folicular	22%
3. Leucemia linfocítica crónica tipo B/ linfoma linfocítico pequeño	6%
4. Linfoma de células del manto	6%
5. Linfoma de células T periféricas	6%
6. Linfoma de células B de la zona marginal	5%

Tomado de Chan, 2001

TABLA 5
LNH MÁS COMUNES EN NIÑOS

1. Linfoma linfoblástico	35%
2. Linfoma de Burkitt	35%
3. Linfoma difuso de células grandes tipo B	6%

Tomado de Chan, 2001

IV. LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES

En el presente trabajo nos enfocamos al estudio de uno de los subtipos de LNH más comunes, el LDCG-B. Esta patología constituye del 30 al 40% de los linfomas en adultos, con una mediana de edad en la 6^a década, aunque se diagnostican casos en todas las edades presentando una incidencia anual en los EUA que excede los 25,000 casos al año (Alizadeh, 2000). El LDCG-B puede presentarse de novo o puede derivar de la transformación de linfomas foliculares y de manera menos frecuente de linfomas de la zona marginal. (Stein, 1992). Se desarrolla como una masa tumoral sintomática en un solo ganglio, aunque también puede presentarse de manera extraganglionar (en sitios como la piel, el tracto gastrointestinal, testículos, tiroides, mama, sistema nervioso central, hueso y MO) en un 40% de los pacientes. (Harris, 1994, Harris, 1995).

Los estudios acerca de la epidemiología de los LNH en México son escasos, sin embargo existe un estudio del año 1998, en donde se analizaron 264 pacientes con LNH y se encontró que dentro de los linfomas ganglionares, la variante difusa de células grandes corresponde al 14%, mientras que el difuso con células mixtas corresponde al 20%. El 66% de los casos correspondieron al linaje B y el 25% al tipo T. (Ortega, 1998). En el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, los LDCG-B ocupan el 52% del total de los linfomas que son atendidos (datos en el archivo).

La morfología histológica de las células presentes en el LDCG-B se caracteriza por células linfoides de tamaño relativamente grande (generalmente de cuatro a cinco veces el diámetro de un linfocito normal) y un patrón de crecimiento difuso. Las células presentan núcleos redondos u ovals que pueden estar multilobulados o hendidos; además de contener 2 o 3 nucleolos por célula, los cuales se encuentran pegados a la membrana y citoplasma basófilo (Cotran, 2001). Las células del LDCG-B se parecen a los centroblastos (células grandes no hendidas, cuyos nucléolos se sitúan junto a la membrana

nuclear) o a los inmunoblastos (células con citoplasma abundante y con 1 ó 2 nucleolos) (Gómez, 2002) (Figura 4).

De acuerdo con la clasificación REAL (Harris, 1994, Harris, 1995), las células tumorales del LDCG-B combinan las categorías de células grandes e inmunoblásticas de la Formulación de Trabajo y presentan el siguiente inmunofenotipo: Sig^{+/-}, CIg^{+/-}, CD45^{+/-}, CD5^{-/+}, CD10^{-/+}, con los siguientes antígenos asociados a células B: CD19, CD20, CD22, CD79a. Pueden presentar marcadores de activación como HLA-DR y CD23, además de que la mayoría de las células ya presentan rearrreglos en los genes de las inmunoglobulinas. La clasificación REAL considera que la contraparte normal del LDCG-B son las células B periféricas en proliferación (Jiménez-Zepeda, 1998, Harris, 1994), sin embargo, otros autores sugieren que la contraparte normal podrían ser células de origen folicular o post-folicular que han tenido contacto con antígenos y que han comenzado a sufrir hipermutaciones somáticas dentro de la región variable de las inmunoglobulinas. (Cuneo, 2000) (Tabla 6).

Según la Formulación de Trabajo, un 79% de los LDCG-B son del tipo B, un 16% son de células T y un 5% presenta los 2 tipos celulares o no se pueden clasificar. Como se mencionó anteriormente la clasificación REAL fue revisada y reorganizada en base al curso clínico de los linfomas, de tal forma que el LDCG-B quedó agrupado dentro de la categoría de los linfomas agresivos con riesgo intermedio. (Hiddemann, 1996).

Los pacientes con LDCG-B presentan una evolución clínica que consiste en la aparición de una masa de crecimiento rápido, situada en una sola región ganglionar o extraganglionar. Aunque puede ser muy variable, la primera manifestación puede aparecer en el tubo digestivo, la piel, huesos o cerebro. También suelen estar afectados el anillo de Waldeyer y los tejidos linfáticos de la orofaringe (amígdalas y adenoides); así mismo, el hígado y el bazo pueden encontrarse alterados. El LDCG-B resulta ser un tumor muy agresivo, dado el gran número de alteraciones genéticas que presenta, de ahí que puede

producir la muerte del individuo si no se trata rápida y adecuadamente (Cotran, 2001). Todo lo anterior pone de manifiesto la importancia de conocer y evaluar las principales alteraciones moleculares que se presentan en este tipo de linfoma, ya que esto podrá contribuir al desarrollo de mejores métodos diagnósticos y de pronóstico.

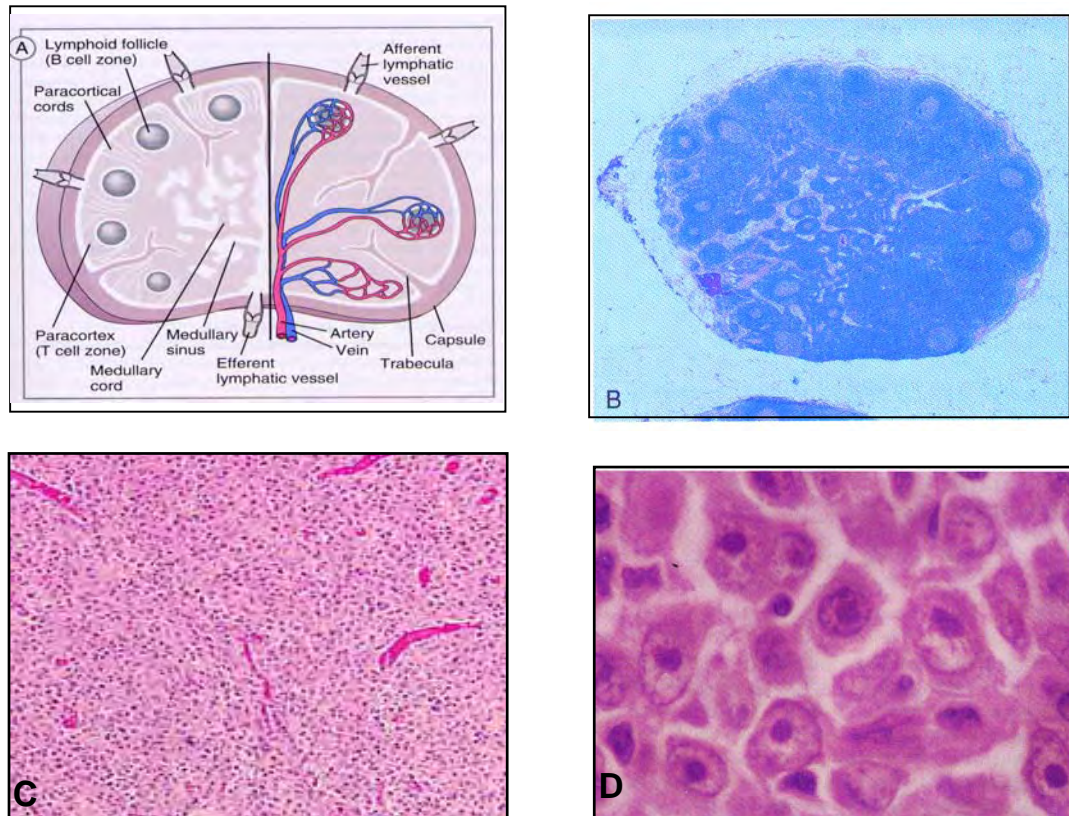


Figura 4. Linfoma Difuso de Células Grandes B.- A y B) Estructura normal de un ganglio linfático, en donde se muestran los nódulos y centros germinales que lo conforman. C y D) Cortes histológicos de un ganglio linfático con LDCG-B, en donde se observa como se pierde la estructura normal del mismo, de tal forma que ya no se observan nódulos ni centros germinales. Los ganglios son invadidos por células linfoides de 4 a 5 veces más grandes que los linfocitos normales, las cuales presentan de 2 a 3 nucleolos por célula.

	B-Cells	Immunoglobulin Genes	Somatic Mutations	Ig Protein	Marker	Corresponding Lymphoma	
Foreign antigen independent	Stem cell	Germ line	None	None	CD34		Bone marrow
	Pro-B-cell §	Germ line	None	None	CD19, CD79a, BSAP, CD34, CD10, TdT		
	Pre-B-cell *	IgH rearrangement μ-chain (Cytoplasm)	None	Igμ	CD19, CD45R, CD79a, BSAP, CD34, CD10, TdT	B-LBL/ALL	
Foreign antigen dependent	Immature B-Cell	IgL/IgH-rearrangements IgM (Membrane)	None	IgM (Membrane)	CD19, CD20, CD45R, CD79a, CD10 BSAP		Peripheral lymphoid tissue
	Mature naive B-cell	IgH/L rearrangements IgM und IgD (Membrane)	None	IgM/IgD	CD19, CD20, CD45R, CD79a, BSAP, CD5	B-CLL, MCL	
	Germinal Center (CB and CC)	IgH/L rearrangements Class switch	Introduction of somatic mutations	Ig (minimal or absent)	CD19, CD20, CD45R, CD79a, BSAP, CD10, BCL6	BL, FL, LPHL, DLBCL, cHL§	
	Memory B-Cell	IgH/L rearrangements	Somatic mutations	IgM	CD19, CD20, CD45R, CD79a, BSAP	MZL, B-CLL	
Terminal Differentiation	Plasma cell	IgH/L rearrangements	Somatic mutations	IgG>IgA>IgD	CD38, Vs38c, MUM-1, CD138	Plasmacytoma/myeloma	

Tabla 6. Desarrollo de linfocitos B y los correspondientes linfomas que se pueden generar en cada estadio linfoide. Dentro del rectángulo se encuentra el LDCG-B (DLBCL) el cual se propone que tiene su origen a partir de linfocitos B de centros germinales, que ya presentan los rearreglos de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas y que han sufrido introducción de mutaciones somáticas, además se muestra el inmufenotipo celular. Tomado de Stein, 2001.

a. Marcadores moleculares del LDCG-B

Una de las principales alteraciones genéticas que se presenta en el LDCG-B es a nivel del gen *bcl-2*, el cual está involucrado en promover la sobrevivencia celular, ya que tiene funciones antiapoptóticas, de tal forma que cuando se encuentra alterado provee de ventajas para sobrevivir a las células tumorales pero con una baja proliferación. (Korsmeyer, 1999). La expresión alterada de este gen puede ocurrir como consecuencia de la translocación $t(14;18)(q32;q21)$, en donde la porción 5' del gen *bcl-2* se transloca al cromosoma 14, junto a los genes JH de las inmunoglobulinas, lo que da como resultado un incremento en la transcripción y la expresión de la proteína *bcl-2*, (Ngan, 1988) y por consiguiente una inhibición de los procesos de muerte celular programada o apoptosis.

Los rompimientos del gen *bcl-2* se llevan a cabo en la región de rompimiento principal, lo que ocurre en el 60% de los linfomas, y en la región de agrupamiento menor, esto último es observado en el 30% de los casos de LNH (Monni, 1999). El rearreglo cromosómico se presenta en un 10% a 30% de los casos de LDCG-B y la sobre-expresión de la proteína se presenta en un 22-80% de los pacientes. (Perscarmona, 1997, Monni, 1997). Se sabe que la sobre-expresión de la proteína *bcl-2* es un factor pronóstico para falla al tratamiento y la presencia del rearreglo cromosómico se utiliza para determinar el pronóstico clínico del paciente. (Gascoyne, 1997, Kramer, 1998).

Por medio del análisis para detectar alteraciones en el número de copias en el DNA (Hibridación Genómica Comparativa) (Kallioniemi, 1992), fue posible detectar amplificaciones del gen *bcl-2*, específicamente en la región 18q21, en un 21% de los pacientes con LDCG-B analizados, pudiéndose encontrar hasta 4 o más copias del mismo (Monni, 1996). Este gen puede estar sobre-expresado en el 31% de los linfomas,

independientemente de la presencia de la translocación t(14;18), siendo éste otro de los mecanismos importantes para la activación de bcl-2 y los desórdenes linfoproliferativos. Cabe señalar que este gen también se puede translocar a cromosomas diferentes del 14, como son el 1, el 16 y el 19. Además, puede tener mutaciones que eviten su unión con otros miembros de la familia de bcl-2 y con genes supresores de tumor (Monni, 1997), impidiéndose, con esto, que lleve a cabo sus funciones antiapoptóticas normales. Resulta interesante señalar que las mutaciones presentes en este gen se han asociado con la transformación del linfoma folicular a LDCG-B (Matolcsy, 1996).

Existen estudios que se han enfocado a analizar la expresión de reguladores apoptóticos en LNH, encontrando que el LDCG-B presenta los niveles más bajos del regulador antiapoptótico bcl-2 y los más altos del regulador proapoptótico bad, en comparación con otros LNH. Con este estudio se demuestra la gran heterogeneidad molecular que pueden presentar los diferentes tipos de LNH (Xerri, 1999). También se ha estudiado la expresión de las proteínas bcl-2, bcl-X y bax (gen proapoptótico) en pacientes con LDCG-B quimiorresistente, encontrándose que solas o en combinación, dichas proteínas están asociadas con la quimiorresistencia en pacientes de sobrevida corta. Además, se ha visto que bcl-X resulta ser un poderoso potenciador de los efectos de inducción de sobrevivencia celular que puede llevar a cabo bcl-2 (Bailey, 1999, Hermine, 1996).

La relación que se puede presentar entre la expresión de bcl-2, p53 (gen supresor de tumor) y la proliferación tumoral ha sido estudiada para tratar de relacionar estos parámetros con la resistencia a drogas en LNH. Se encontraron alteraciones en p53 (mutaciones o sobreexpresión), en un 21% de los pacientes (16 de 75) y de éstos, el 56% fue más susceptible a generar resistencia a drogas, en comparación con los que tenían p53 normal, además de tener progresión libre de enfermedad y sobrevida, significativamente más cortas (Ichikawa, 1992, Farrugia, 1994, Wilson, 1997). En contraste con los trabajos

mencionados anteriormente, para *bcl-2* no se encontró asociación significativa entre su expresión y la resistencia a drogas. Sin embargo, cuando esta proteína estaba sobrepresada en pacientes que presentan linfomas con histología de grado intermedio (53%), se tendió a generar resistencia a drogas, encontrándose una asociación significativa entre niveles altos de *bcl-2* y proliferación baja del tumor (Wilson, 1997).

Otro gen relevante en el estudio del LDCG-B es el gen *c-myc*, el cual es una fosfoproteína nuclear que regula la progresión del ciclo celular, la inmortalización, la apoptosis y la diferenciación celular (Ryan, 1996). El gen *c-myc* se encuentra involucrado en la translocación $t(8:14)(q24;q32)$, la cual da como resultado la fusión de los genes *c-myc* e inmunoglobulinas; esto trae como consecuencia su desregulación genética y su sobreexpresión (McKeithan TW, 1990). Esta translocación se encuentra en la mayoría de los linfomas de Burkitt, sin embargo, también se presenta en un 15% de los casos de LDCG-B. (Chenevix-Trench, 1986). Además de la translocación mencionada, este gen puede presentar otro tipo de alteraciones genéticas como mutaciones en la región de unión a las proteínas con las que interacciona (Bradley, 1993). Incluso se ha detectado que en células malignas de linfoma la proteína *c-myc* puede ser más estable que en células normales, lo anterior se ha asociado con la transformación de linfomas de centro folicular de bajo grado hacia LDCG-B de alto grado (Albalwi, 1999).

El gen *bcl-6* es un factor de transcripción muy importante en el desarrollo, diferenciación y control del ciclo celular de los linfocitos B; particularmente está involucrado en la formación de centros germinales (Shaffer, 2000). En un 35% de los casos de LDCG-B, se encuentra alterado a través de la translocación $t(3,14)(q27;q32)$ (Kerckaert, 1993, Ohshima, 1997). Puede estar fusionado con porciones de genes diferentes a los de las inmunoglobulinas, como el gen *Ikaros* (Hosokawa, 2000); este tipo de arreglos son indicadores de mal pronóstico (Akasaka, 2000). También puede estar alterado por

mutaciones somáticas en el 50% de los pacientes (Vitolo, 2002, Capello, 2000). Es generalmente aceptado que las alteraciones en *bcl-6*, *bcl-2* y *myc* representan las lesiones primarias en la patogenia de los LDCG-B tipo B, y que las mutaciones en *p53* y las deleciones en 6q representan las lesiones secundarias (Volpe, 1996).

La caspasa 1 también conocida como *ICE* o interleukin-1B converting enzyme es una proteasa de cisteinas que pertenece a la familia de las caspasas y se le considera dentro del grupo de las caspasas iniciadoras de apoptosis, además de jugar un papel importante en los procesos inflamatorios (Strasser A et. al. 2000). Se sabe que esta molécula se encuentra dentro de la cascada de señalización apoptótica inducida por la vía de Fas/APO-1/CD95 (Susin SA, et al. 1997). El papel que juega esta molécula en el desarrollo de los LDCG-B no ha sido analizado, sin embargo se sabe que puede participar en la inducción de apoptosis en células leucémicas y de mieloma (Mariani SM, et. al. 1997) así como en los síndromes mielodisplásicos (Mundle SD, 1996). Lo anterior la coloca como una molécula importante para su estudio dentro de las neoplasias linfoides.

b. Avances recientes en el estudio molecular del LDCG-B

El LDCG-B ha sido estudiado por Alizadeh y colaboradores por medio de microarreglos. Dicho grupo de investigación construyó una nueva versión de microarreglo denominado *Linfochip*. Esta nueva versión incluye 18,000 genes provenientes de bibliotecas de ADN complementario de centros germinales de células B, LDCG-B, linfoma folicular, linfoma de células del manto y leucemia linfocítica crónica. Para su construcción también se aplicaron genes inducibles durante la activación por mitógenos y citocinas de linfocitos T y B, así como un grupo de genes que son importantes en la biología del cáncer. Utilizando este *Linfochip* se caracterizaron los patrones de expresión genética de 3 neoplasias linfoides: LDCG-B tipo B (n=42), linfoma folicular (n=6) y leucemia linfocítica crónica-B (n=11). De

igual forma se obtuvieron los perfiles de expresión de muestras normales de linfocitos activados, de amígdalas, de ganglios linfáticos, y de varias líneas celulares de linfoma y de leucemia. Gracias al *Linfochip* fue posible clasificar al LDCG-B en dos subtipos completamente diferentes, los cuales previamente no habían sido descritos (Alizadeh AA, 2000). El primer subtipo corresponde a aquel en el que se expresan genes que regularmente son expresados por los linfocitos B de centro germinal (LB-CG), mientras que en el otro subtipo se expresan genes que regularmente son expresados en los linfocitos B activados de sangre periférica (LB-SP). En la Tabla 7 se muestran los genes marcadores para cada uno de los 2 subtipos identificados. El estudio también demuestra que el subtipo de LB-CG tienen un mejor pronóstico (76% de los pacientes siguen vivos después de 5 años), que el subtipo de LB-SP (16% de los pacientes siguen vivos después de 5 años) (Alizadeh AA, 2000).

El *Linfochip* permitió diferenciar entre sí diferentes neoplasias linfoides, a través de la obtención de lo que ahora se denomina como “huellas de expresión genética” o “retratos moleculares”; además, permitió identificar entidades clínicas particulares, dentro del LDCG-B tipo B, que no había sido posible diferenciar. Por otra parte, hasta este momento no se sabía a qué estadio de activación y de diferenciación, dentro de las diferentes subpoblaciones de células B normales, correspondían los diferentes tipos de linfomas. Una de las principales aportaciones generadas por el trabajo de Alizadeh y colaboradores, es que en base a los patrones de expresión genética se estableció la identidad de la subpoblación de células B normales a la que corresponden los dos subtipos de LDCG-B tipo B encontrados.

Aunado a lo anterior, mediante el uso de microarreglos de oligonucleóticos en combinación con modelos matemáticos, el grupo de Shipp y colaboradores han podido predecir si el LDCG-B responderá, o por el contrario si será fatal o refractario, al tratamiento basado en ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona. Además, estos autores agruparon a los genes que son críticos para el pronóstico del LDCG-B, dentro de los cuales

se encuentran aquellos involucrados en la señalización del receptor de células B, las vías de fosforilación de serinas/treoninas y en diferentes vías de apoptosis (Shipp MA, 2002). Ese mismo año, como parte del Proyecto del “Perfil Molecular de los Linfomas/Leucemias”, se utilizó el *Linfochip* en 236 pacientes que recibieron el tratamiento de quimioterapia mencionado anteriormente. Una vez obtenidos los patrones de expresión, se seleccionaron 16 genes para obtener un “*molecular predictor*” basado en aquellos genes que presentaron la mayor variación entre los diferentes subtipos de LDCG-B. Con los genes seleccionados, se realizó un análisis a partir del cual fue posible predecir la supervivencia después del tratamiento con quimioterapia a través de la generación de un “marcador molecular para predecir supervivencia” (Rosenwald A, 2002).

TABLA 7
NUEVA CLASIFICACION DEL LDCG-B
BASADA EN PATRONES DE EXPRESION GENETICA

LB-CG	LB-SP
CD 10 y CD38.- marcadores de superficie	IRF4.- factor regulador de interferón
A-MYB.- factor nuclear	FLIP.- regulador de apoptosis
OGGI.- reparación de DNA	BCL-2.- gen anti apoptotico.
BCL-6.- maduración de linfocitos B	
BCL-7A.- fisiología normal de centros germinales	
LMO2.- inhibidor de la diferenciación de células B	

LB-CG.- Linfocitos B de Centro Germinal

LB-SP.- Linfocitos B de Sangre Periférica

V. ANTECEDENTES

a. LDCG-B: ¿Origen en médula ósea?

La ontogenia de los linfomas malignos ha sido poco estudiada, aceptándose que la transformación maligna ocurre en algún estadio durante la linfopoyesis, lo cual da como resultado la generación de una clona que permanece detenida en algún punto en particular del desarrollo, por lo que presenta muy poca diferenciación posterior. El origen de las alteraciones responsables de la generación del LDCG-B no está del todo entendido, sin embargo, se ha planteado la posibilidad de que en el LDCG-B, al igual que en otras neoplasias hematológicas, la transformación maligna se lleve a cabo en una célula primitiva presente en la médula ósea, la cual migre hacia tejidos linfáticos y sea ahí en donde se hagan evidentes las manifestaciones de la enfermedad. El concepto anterior acerca de que los linfomas no-Hodgkin puedan tener su origen en la médula ósea ya ha sido mencionado con anterioridad (Staples WG, 1977), basándose principalmente en la existencia de nódulos linfoides o agregados linfoides en la médula ósea, los cuales aumentan con la edad. Estas últimas estructuras linfoides han representado grandes retos para los patólogos, dada la dificultad para discernir entre nódulos neoplásicos y no neoplásicos (Rywlin, 1974, Ben-Ezra JM, et al 1994).

Existen reportes que indican la presencia de células de LNH presentes en la médula ósea como presentación primaria de la enfermedad, describiendo además que los pacientes presentan fiebre, función anormal del hígado, pancitopenia, síntomas neurológicos, infecciones oportunistas y curso fatal de la enfermedad (Staples WG. 1977, Ponzoni M, 1994). Por otro lado, se sabe que existe una variedad de linfoma que puede presentarse de manera inicial en la médula ósea, se trata del linfoma B intravascular, el cual se piensa tiene

su origen en células B prefoliculares (Ito M, 2003). La presencia de este tipo de linfoma ha sido detectada en sangre periférica y médula ósea por análisis morfológicos, siendo clasificado como un grupo heterogéneo de neoplasmas que puede originarse a partir de más de un precursor de células B, dada la presencia de tres diferentes inmunofenotipos (CD20+CD5-, CD20+CD5+, CD20+CD5-CD10+) (Estalilla, 1999). De manera similar algunos tipos de desórdenes linfoproliferativos de células B ricos en células T también han sido reportados exclusivamente en médula ósea (Aboul-Nasr R, et. al. 2001).

Los estudios mencionados anteriormente sugieren que los linfomas pueden originarse en la médula ósea, pero aún no queda claro a que nivel dentro de la cascada de diferenciación linfopoyética pudieran tener origen las alteraciones responsables de la generación del linfoma. Gniadecki y cols en el 2003 estudiaron un linfoma de células T que puede progresar hacia linfoma anaplásico cutáneo de células grandes (LAC) denominado, papulosis linfomatoide (PL). En dicha patología se analizó el rearrreglo monoclonal del receptor de células T (TCR) en piel, sangre y médula ósea encontrándose que el rearrreglo se encontraba presente en la médula ósea años antes de la generación de las lesiones cutáneas de PL o de LAC. Por lo anterior los autores sugieren que la transformación maligna inicial en los linfomas T extaganglionares ocurre en alguna célula progenitora hematopoyética y no en la piel como se anteriormente se pensaba (Gniadecki R et al, 2003).

En lo que se refiere al LDCG-B recientemente se describió una nueva variedad clasificada en base a la expresión del antígeno CD5 (B S et al, 1999, Yamaguchi M et al, 2002, Kobayashi T et al, 2003.). Dicho subtipo (LDCG-B D5+) ha sido analizado a través de estudios citogenéticos (bandeo de cromosomas y estudios en interfase), así como en análisis de mutaciones somáticas en la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgVH). Los autores sugieren que el LDCG-B CD5+ proviene del mismo progenitor mutado CD5+ que genera la leucemia linfocítica crónica de células B/ linfoma

linfocítico (B-CLL) (Katzenberger T, 2003). Otro estudio relevante es el de Strauchen y cols en el 2003, en donde se reportan 4 casos de LDCG-B primarios en médula ósea con presentaciones hematológicas de leucoeritoblastosis y pancitopenia, sin presencia de linfadenopatía (Strauchen JA, 2003) y cuerpos linfoglandulares además de necrosis (Stern, 2001). En dicho artículo se menciona que el origen de este tipo de linfoma no está claro, siendo posible que se genere a partir de folículos linfoides; sin embargo, no se especifica si se trata de un LDCG-B que se originó en la médula ósea o si su presencia en la médula ósea fue resultado de la infiltración de células malignas provenientes de otro órgano. Por otro lado Wong KF y cols en 1992 ya habían reportado el mismo fenómeno, de LDCG tipo B y T, con presentación inicial en médula ósea y ausencia de linfadenopatía, con síntomas de citopenia, síndrome hemofagocítico e infiltración a hígado y bazo. Para este estudio se hace énfasis en que la presentación inicial en médula ósea puede ser muy sutil y por lo tanto existir la posibilidad de que pase desapercibida en estudios morfológicos. (Wong KF, 1992). Uno de los estudios más recientes es el realizado por Álvarez y cols, los cuales detectaron la presencia de LDCG-B como una enfermedad que se presenta en médula ósea y sangre sin evidencia de infiltración en bazo o ganglios linfáticos. Los casos fueron analizados por M-FISH (multicolor fluorescent *in situ* hybridization), encontrando translocaciones entre 2p y 9p, entre 14q y 11q, anormalidades en 7q, y en 9q en el gene de INK4a y en el locus de bcl-2 (dichas alteraciones pasan desapercibidas por análisis de bandeado de cromosomas). Sin discutir nada acerca del origen de la enfermedad los autores ponen énfasis en la heterogeneidad que puede presentar el LDCG-B tanto a nivel biológico como citogénético y la necesidad de ampliar las investigaciones para la caracterización de esta enfermedad; además de la necesidad de examinar la médula ósea como una herramienta de diagnóstico primario en el contexto de las neoplasias linfoides (Alvares LC, 2004).

Dos ejemplos claros acerca del debate que existe sobre el origen del linfoma son los mencionados a continuación para la subtipo de LNH denominado linfoma folicular, el cual se caracteriza por presentar en más de un 70% de los casos la t(14;18) (Korsmeyer S, 1992). En este tipo de linfoma ha sido posible la detección de la translocación en progenitores hematopoyéticos CD34+CD19+, por lo que los autores consideran que tal vez el evento oncogénico inicial que da origen al linfoma folicular se presente en la médula ósea, antes de la migración a los ganglios linfáticos (Macintyre, 1995). De manera contraria el grupo de Voso y cols, reportan que no fueron capaces de detectar células CD34+CD19+ positivas para dicha translocación, por lo que se sugiere que el linfoma folicular proviene de células B precursoras o células B maduras que han perdido la expresión del antígeno CD34+ y han salido de la médula ósea para poblar los ganglios linfáticos (Voso MT, et. al. 1997).

b. Hematopoyesis y LDCG-B

Hasta ahora, los estudios histológicos, citogenéticos y moleculares del LDCG-B se han realizado en ganglios linfáticos. Lo anterior es debido a que, tradicionalmente, se ha considerado que el origen de esta enfermedad es a nivel de dichos órganos; además de que las manifestaciones clínicas y de laboratorio ocurren precisamente en ellos. Los linfomas pueden diseminarse a la médula ósea (principalmente en estadios avanzados de la enfermedad), definiendo estadio IV de la enfermedad y la necesidad de aplicar al paciente intensos tratamientos con quimioterapia dado el mal pronóstico. Aunque puede ser variable, entre el 30 y 40% de todos los pacientes con LNH tienen infiltración en la médula ósea en el momento del diagnóstico, por lo que el estudio de la médula ósea por aspiración (frotis) y biopsia (cresta ilíaca) se practica de manera rutinaria en este tipo de pacientes. Según la formulación de trabajo en el LDCG-B la infiltración de células neoplásicas hacia la médula ósea ocurre entre el 10-12% (Rosenberg, 1982) y según la clasificación REAL en un 3-17%

(Harris, 1994), siendo más frecuente en los LDCG-B ricos en células T (62% contra 8% en LDCG-B) (Skinnider BF, 1997) y en linfomas de bajo grado como el linfoma linfocítico, linfoma de centro folicular y el linfoma de células del manto.

La médula ósea de pacientes con linfoma no Hodgkin ha sido estudiada desde el punto de vista clínico, con el propósito de realizar *monitoreos moleculares* para la detección de enfermedad mínima residual en pacientes que van a recibir trasplantes autólogos (Galimberti, 2002). Por otro lado, también se han realizado estudios para evaluar la capacidad de expansión *ex vivo* de CSH de pacientes con LNH y detectar la presencia de células positivas para la t(14;18) contaminantes en médula ósea y sangre periférica movilizada. El propósito de éstos análisis es el de hacer purgas de células progenitoras CD34+ (depletadas de células CD19+ y células CD20+) que presenten la translocación y de esta forma evitar, durante el trasplante, reinfundirle al paciente células neoplásicas que no hayan sido eliminadas durante el tratamiento (Yao M et al, 2000, Papajik T et al, 2001, Yakoyama J et al. 2003).

Es bien sabido que el sistema hematopoyético se encuentra alterado en una gran variedad de neoplasias hematológicas, incluyendo a los síndromes mielodisplásicos y a los diversos tipos de leucemias (Flores, 1999, Espinoza-Hernandez, 2001). En el caso del LDCG-B, se considera que la médula ósea en esta patología es normal, siempre y cuando no exista infiltración de células malignas. Sin embargo, un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio sugiere que esto no es del todo cierto. Empleando sistemas de cultivo *in vitro*, se encontró una reducción del 35% en el número de progenitores hematopoyéticos, tanto mieloides como eritroides, en la médula ósea de pacientes con LDCG-B, en comparación con la médula ósea de sujetos sanos. Dichos progenitores, además, presentaron proliferación deficiente en cultivos a largo plazo tipo Dexter, en comparación con cultivos de médula ósea normal. En dicho estudio, también se encontró que los progenitores de fibroblastos estaban

disminuidos en más de un 50%, así como una reducción muy significativa en los niveles de las moléculas estimuladoras de la hematopoyesis como *stem cell factor* e interleucina 6 (Huerta-Zepeda, 2000). Un estudio más reciente demostró que los progenitores hematopoyéticos presentes en la población que expresa el antígeno CD34+ pero carentes de linaje (LIN-) de pacientes con LDCG-B, presentan disminución en los potenciales de expansión y de proliferación *in vitro*, antes y después del tratamiento con quimioterapia. Se propone que las células progenitoras CD34+ anormales pudieran estar involucradas en el origen y en la progresión de la enfermedad (Martínez-Jaramillo G et al, 2004).

VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los hallazgos descritos en los párrafos anteriores demuestran que, contrario a lo que se había considerado por mucho tiempo, parecen existir alteraciones cuantitativas y cualitativas, al menos *in vitro*, en el sistema hematopoyético de pacientes con LDCG-B. Dichas alteraciones comprenden tanto al compartimiento de progenitores hematopoyéticos - incluyendo a los linajes mieloide y eritroide- como a los elementos del microambiente medular. Hasta el momento las alteraciones que ocurren en el sistema hematopoyético de pacientes con linfoma maligno han sido estudiadas sólo en forma limitada.

Al mismo tiempo dichos hallazgos plantean la posibilidad de que las alteraciones genéticas que se presentan en este tipo de neoplasia se están originando en algún tipo de progenitor hematopoyético muy primitivo presente en la médula ósea de estos pacientes. Como ya se mencionó la mayoría de los estudios sobre la biología molecular del LDCG-B, se han enfocado a células presentes en los ganglios linfáticos y en la sangre periférica de estos pacientes (Monni O, 1997, Rao, 1998, Alizadeh AA, 2000).

Nosotros pretendemos estudiar genes claves (ICE, C-MYC, BCL-2 y P53) (Figura 5), en procesos celulares, como proliferación y apoptosis, así como en el desarrollo de linfomas (Macintyre E, 2000) en diferentes poblaciones hematopoyéticas presentes en la médula ósea de pacientes con LDCG-B. Lo anterior con la finalidad de detectar anomalías en la expresión de dichos genes en células hematopoyéticas primitivas; las anomalías detectadas pudieran desencadenar o contribuir a la generación del LDCG-B, una vez que estas células llegan a los ganglios linfáticos.

En este estudio analizamos 3 poblaciones celulares presentes en médula ósea de pacientes con LDCG-B. La primera de ellas es la población celular CD34+CD38-LIN- la cual corresponde del 0.005 al 0.01% de la médula ósea normal (Terstappen LWMM, 1991, Cardoso, 1993), y representa la sub-población más primitiva analizada. La siguiente población corresponde a las células CD34+LIN- los cuales corresponden alrededor del 1% de las células de la médula ósea normal (Krause SD, 1996). Finalmente analizamos a las células mononucleares (CMN) las cuales corresponden aproximadamente al 98% de la médula, siendo este el grupo celular más maduro analizado dentro de la diferenciación hematopoyética.

VII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Analizar genes claves en proliferación y apoptosis en progenitores hematopoyéticos de médula ósea de pacientes con LDCG-B.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a. Analizar la frecuencia de las poblaciones celulares CD34+LIN- y CD34+CD38-LIN- presentes en la médula ósea normal de pacientes con LDCG-B.
- b. Determinar la expresión genética y de proteínas de ice, c-myc, bcl-2 y p53 en células mononucleares de médula ósea normal y de pacientes con LDCG-B.
- c. Determinar la expresión genética y de proteínas de ice, c-myc, bcl-2 y p53 en la población celular CD34+LIN- de médula ósea normal y de pacientes con LDCG-B.

- d. Determinar la expresión genética y de proteínas de ice, c-myc, bcl-2 y p53 en población celular CD34+CD38-LIN- de médula ósea normal y de pacientes con LDCG-B.

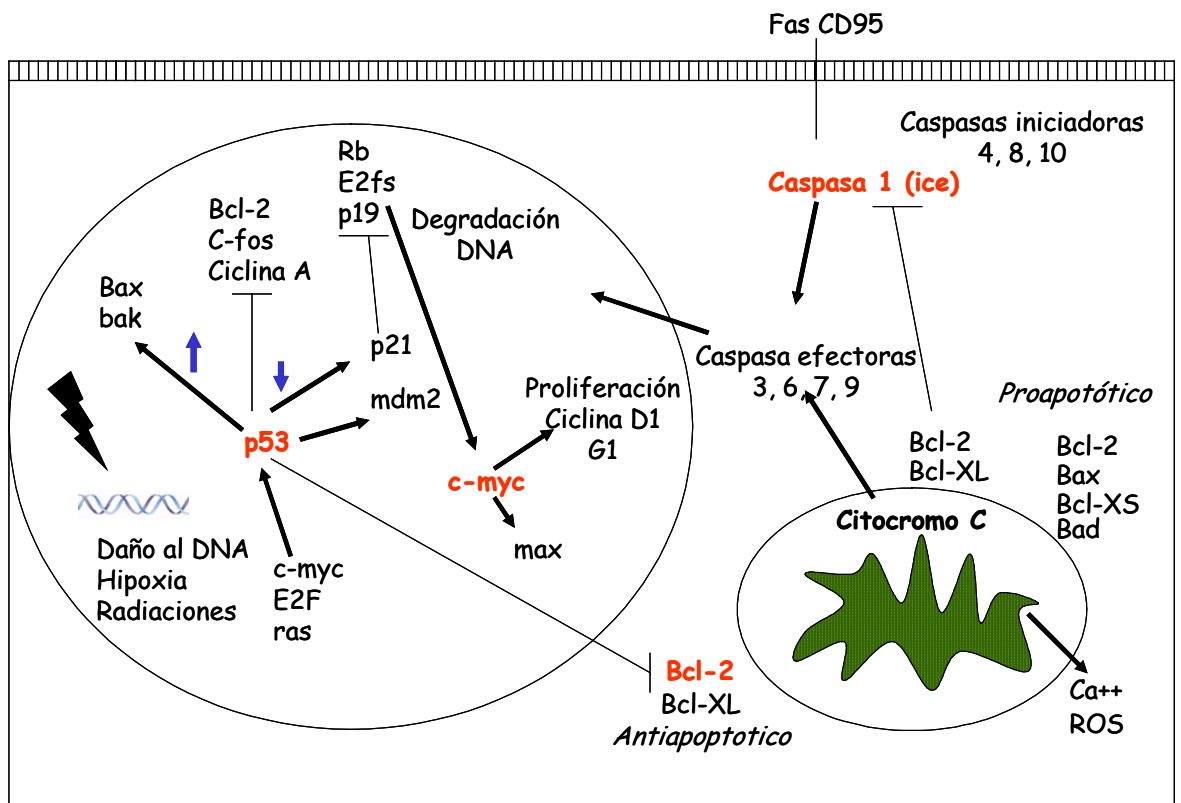


Figura 5.- Conexiones moleculares entre los genes ICE, BCL-2, P53 y C-MYC.- Se muestra la ubicación celular de la expresión de los diferentes genes analizados en el presente estudio, así como las principales conexiones moleculares entre cada uno de los ellos. → Indica activación genética, —| Indica represión genética.

VIII. METODOLOGÍA

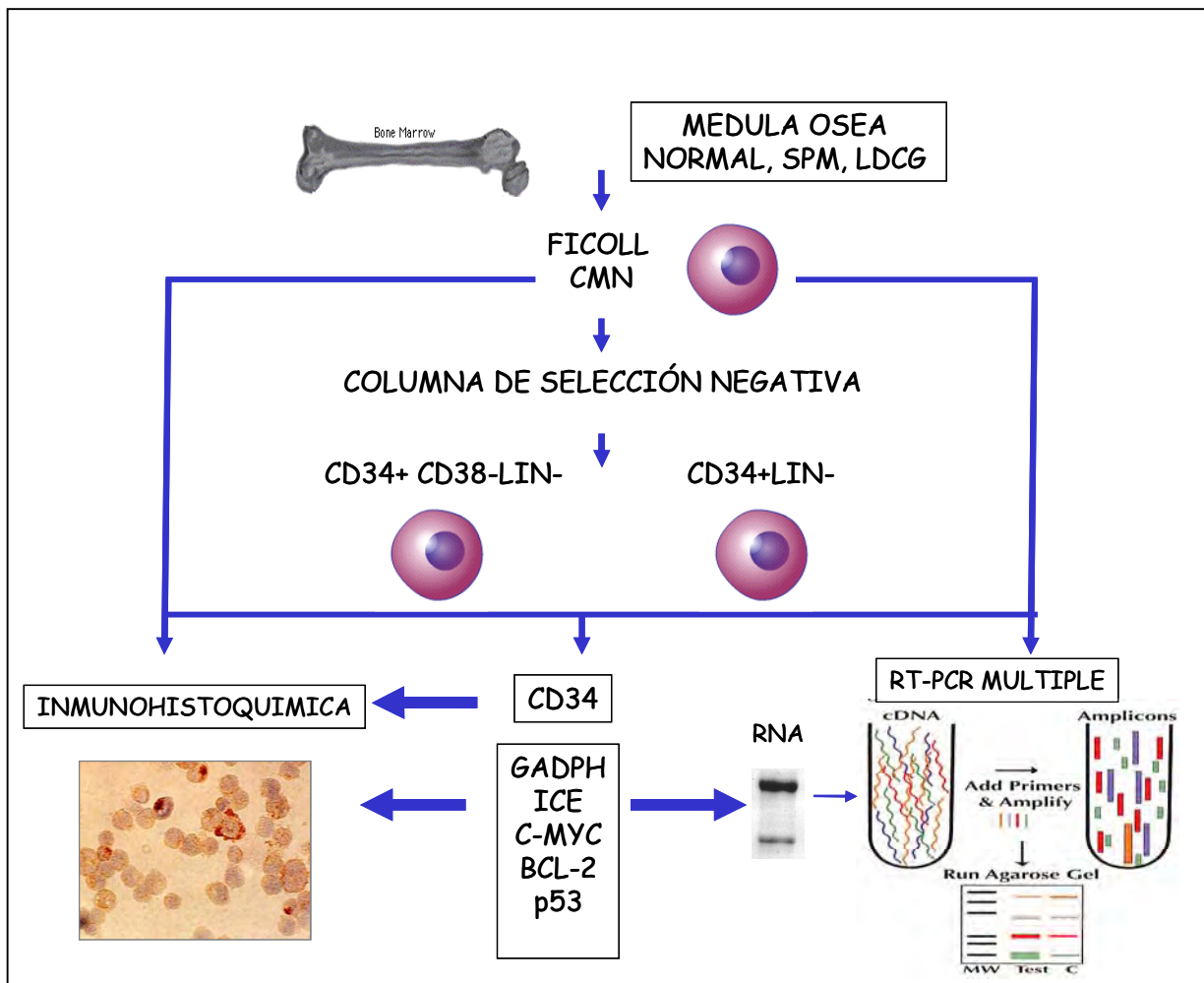


Figura 6. Esquema general de la metodología seguida. CMN.- células mononucleares, SPM.- sangre periférica movilizada, LDCG-B.- linfoma difuso de células grandes tipo B.

VIII. METODOLOGÍA

a. Pacientes

Se procesaron 32 muestras de médula ósea de pacientes con LDCG-B provenientes del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, dentro del período que comprende de Octubre de 2001 a Octubre de 2003. También se procesaron 5 muestras de MO normal y 12 muestras de sangre periférica movilizada (SPM), provenientes del Hospital de Especialidades dentro del mismo instituto.

b. Procesamiento de muestras

1. Separación de poblaciones celulares de médula ósea CD34+LIN- y CD34+CD38-LIN-

Todas la muestras fueron procesadas para obtener CMN por medio de Ficoll-Hypaque (Pharmigen, USA), dicha población la denominamos como **Población I**. También se obtuvieron las poblaciones celulares **CD34+LIN-** y **CD34+CD38-LIN-**, las cuales fueron denominadas como **Población II** y **Población III** respectivamente. Estas ultimas poblaciones fueron obtenidas a través de columnas de selección negativa (StemSep for Human Cells, Stem Cell Technologies, Vancouver Canadá) (Figura 7). Dicha selección se basa en la eliminación de las células que presentan marcadores de linaje en su superficie celular, a través de la utilización de anticuerpos anti-linaje. Para el enriquecimiento de

células CD34+LIN- se utilizó el siguiente cocktail de anticuerpos: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b, glicoforina A. Para el enriquecimiento de células CD34+CD38-LIN- se utilizaron los siguientes anticuerpos: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD36, CD38, CD45RA, CD56, CD66b, y glicoforina A. Posteriormente se adicionó un coloide magnético que se une a los anticuerpos antes mencionados, de tal forma que al pasar las células a través de la columna de separación acoplada a un magneto, las células marcadas quedaron adheridas. Así las células que atravesaron por la columna fueron las que se utilizaron para los experimentos, siendo células que no presentaban ningún tipo de marcaje en la membrana celular, de ahí que se hable de una selección negativa. El conteo y la viabilidad de las células obtenidas fueron analizados utilizando azul tripano.

COLUMNA DE SELECCIÓN NEGATIVA

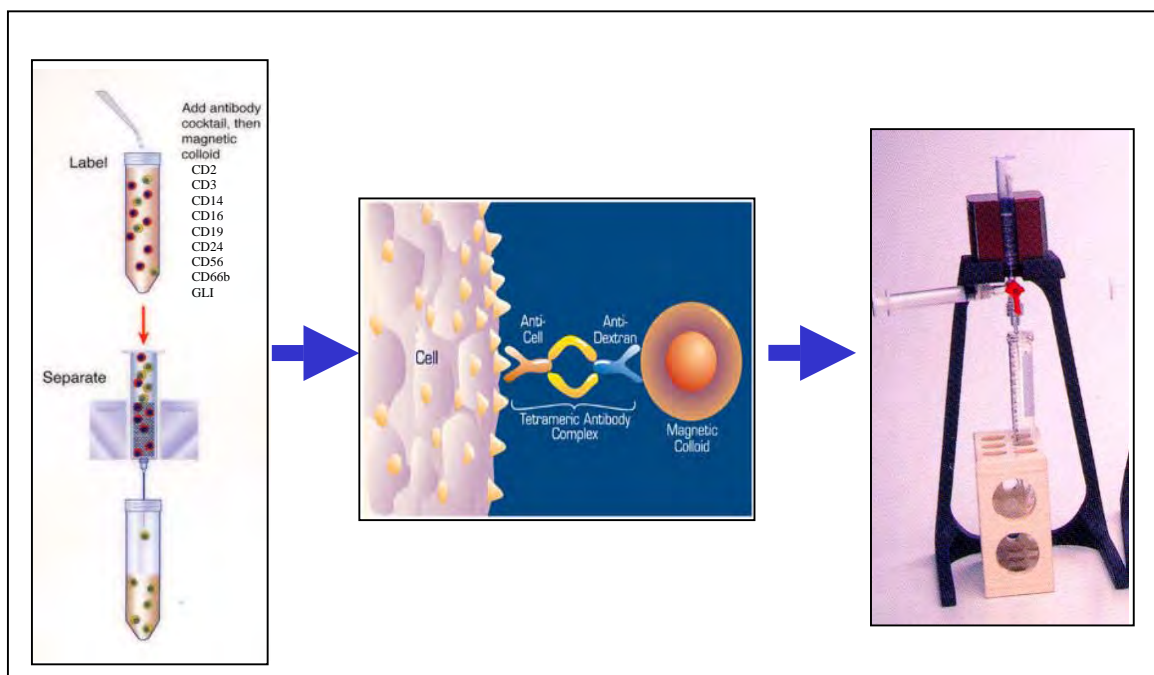


Figura 7. Columnas de selección negativa Stem Sep (StemSep for Human Cells, Stem Cell Technologies, Vancouver Canadá). Se muestra el mecanismo de selección utilizado para la separación de las poblaciones celulares CD34+LIN- (Población II) y CD34+CD38-LIN- (Población III).

c. Inmunohistoquímica (IH)

Se prepararon laminillas con las tres diferentes Poblaciones celulares, cada una con aproximadamente 3×10^4 células, las cuales fueron fijadas con acetona durante 10 min y almacenadas a -20°C hasta su posterior uso. Con dichas laminillas se realizaron experimentos de IH utilizando el kit StrAviGen MultiLink Kit (BioGenex) y anticuerpos monoclonales para CD34 (Clone M708 Dako) a una dilución de 1:70. También se utilizaron anticuerpos para **c-myc** (9E10): *sc-40* Santa Cruz Biotechnology, **p53** (*Bp53-12*): *sc-263* Santa Cruz Biotechnology, **caspasa-1** p10 (c20): *sc-515* Santa Cruz Biotechnology y **bcl-2** (100): *sc-509* Santa Cruz Biotechnology). Como control positivo de expresión se utilizó la línea celular Raji y como control negativo la línea celular de ratón 32D.

d. RT-PCR Multiplex

A partir de aproximadamente 5×10^5 células de la Población I y 3×10^5 células de la Población II y Población III obtenidas de las diferentes muestras, se extrajo el RNA utilizando Tripure (Roche, USA). El RNA de todas las muestras fue tratado con el kit DNA-free (Ambion, USA), para eliminar la contaminación de DNA. El RNA fue cuantificado por espectrofotometría y la integridad fue analizada por medio de geles de agarosa al 1%. La síntesis de cDNA se llevó a cabo con el kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies, USA) a partir de 500 ng de RNA, siguiendo las especificaciones del proveedor. Con el cDNA obtenido se amplificaron los genes GADPH, *ice*, *c-myc*, *bcl-2* y *p53*, mediante una PCR Multiplex utilizando el kit

CytoXpress Multiplex cDNA Amplification kit (Biosource, EUROPE S. A). En la misma reacción de PCR se amplificaron los diferentes productos, incluyendo el control constitutivo de expresión, por lo que en este caso en lugar de realizar 5 reacciones de PCR (una por cada gen), únicamente se lleva a cabo 1 sola reacción. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 ciclos a 96°C 1 min, 57°C 1 min, 68°C 1 min; 30 ciclos a 94°C 1 min, 57°C 3 min, 68°C 2 min y una extensión final a 70°C 10 min. Los productos obtenidos se almacenaron a -20°C. Como control positivo para la expresión de los genes analizados se utilizó el RNA proveniente de la línea celular Raji. Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. A las imágenes obtenidas se les realizó un análisis densitométrico utilizando el programa GeneTools.

e. Análisis Estadístico

Se realizaron pruebas de *t de Student* para determinar diferencias estadísticas en la expresión genética entre muestras normales y de linfoma. Para evaluar las diferencias en los resultados de IH se realizó una prueba estadística no paramétrica de *U Mann-Whitney* $p < 0.05$.

IX. RESULTADOS

a. Características clínicas y hematológicas de los pacientes

Se procesaron 32 muestras de médula ósea de pacientes con LDCG-B provenientes del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, dentro del período que comprendió de Octubre de 2001 a Octubre de 2003. También se procesaron 5 muestras de médula ósea normal y 12 muestras de sangre periférica movilizada (SPM), provenientes del Hospital de Especialidades dentro del mismo instituto. Los parámetros hematológicos de los pacientes se muestran en la Tabla I. El 46.8% de las muestras correspondieron al sexo femenino (15 de 32) y el 53.1% al sexo masculino (17 de 32), teniendo un rango de edad entre 24 a 88 años de edad. Según el Índice Pronóstico Internacional (IPI del inglés International Prognostic Index) las muestras presentaron linfoma de grado alto en un 37.5%, grado alto intermedio en un 43.8%, grado bajo intermedio en un 15.6% y de grado bajo en un 3.1%. Del total de los pacientes el 53.1% de ellos presentaron falla al tratamiento (F) y el 46.8% presentaron remisión completa (R) (Tabla II).

Tabla II. Características clínicas de los pacientes

Sexo (M:F)	17:15
Edad (Años)	24-88
Infiltración médula ósea	0
<i>Índice Pronóstico Internacional</i>	
Alto	37.5 %
Alto intermedio	43.8 %
Bajo intermedio	15.6%
Bajo	3.1%
Falla al tratamiento	53.1 %

Remisión completa	46.8 %
-------------------	--------

TABLA 1. PARÁMETROS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES CON LDCG-B

LINFOMA	SEXO/EDAD	Hb (g/dl)	LEUCOCITOS (x10 ⁹ /l)	PLAQUETAS (x10 ⁹ /l)	ESTADO ACUTAL	IPI	TIPO CELULAR ANALIZADO
LDCG-B 31	F/63	13.9	6 700	297 000	R	ALTO	CMN
LDCG-B 37	M/73	14.1	7 900	347 000	R	ALTO INTERMEDIO	CMN
LDCG-B 38	M/84	13.0	6 900	26 700	F	BAJO INTERMEDIO	CMN
LDCG-B 44	M/88	9.8	8 300	124 000	R	ALTO INTERMEDIO	CMN
LDCG-B 15	M/50	8.0	8 800	643 000	F	ALTO INTERMEDIO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 17	F/66	15.1	8 200	335 000	F	ALTO INTERMEDIO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 18	F/72	10.7	5 200	368 000	R	BAJO INTERMEDIO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 19	F/24	12.0	9 200	204 000	F	ALTO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 20	F/70	12.4	8 400	232 000	R	ALTO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 21	M/32	12.0	12 800	233 000	R	ALTO INTERMEDIO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 24	M/58	15.9	4 300	200 000	F	ALTO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 28	M/72	11.9	5 000	385 000	F	ALTO INTERMEDIO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 32	F/58	13.7	5 300	235 000	R	ALTO	CMN, CD34+LIN-*
LDCG-B 33	F/70	12.5	9 900	351 000	F	BAJO INTERMEDIO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 35	F/67	11.8	6 500	284 000	R	ALTO INTERMEDIO	CMN, CD34+LIN-*
LDCG-B 39	F/71	13.7	4 300	250 000	R	BAJO INTERMEDIO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 41	F/74	13.1	5 800	314 000	F	ALTO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 43	M/34	12.0	9 300	140 000	F	ALTO INTERMEDIO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 50	M/62	11.7	9 000	393 000	R	ALTO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 53	F/67	12.0	5 700	308 000	F	ALTO INTERMEDIO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 54	F/71	12.9	8 800	533 000	F	ALTO	CMN, CD34+LIN-
LDCG-B 25	F/42	12.1	5 800	353 000	R	BAJO INTERMEDIO	CMN, CD34+CD38-LIN-
LDCG-B 29	F/50	12.8	°29 200	181 000	F	ALTO INTERMEDIO	CMN, CD34+CD38-LIN-
LDCG-B34	M/24	13.6	8 600	211 000	R	ALTO	CMN, CD34+CD38-LIN-
LDCG-B 40	F/73	15.7	6 300	235 000	R	ALTO INTERMEDIO	CMN, CD34+CD38-LIN-*
LDCG-B 43	M/34	12.0	9 300	140 000	F	ALTO INTERMEDIO	CMN, CD34+CD38-LIN-
LDCG-B 45	M/74	10.6	7 900	266 000	F	ALTO INTERMEDIO	CMN, CD34+CD38-LIN-
LDCG-B 46	M/31	14.8	9 200	365 000	R	ALTO	CMN, CD34+CD38-LIN-
LDCG-B 47	M/43	15.0	7 700	231 000	F	BAJO	CMN, CD34+CD38-LIN-
LDCG-B 48	M/52	13.9	10 800	175 000	R	ALTO	CMN, CD34+CD38-LIN-
LDCG-B 51	M/31	10.4	15 100	512 000	F	ALTO	CMN, CD34+CD38-LIN-
LDCG-B 52	M/50	16.4	11 500	214 000	F	ALTO INTERMEDIO	CMN, CD34+CD38-LIN-

F.- Femenino, M.- masculino, Edad en años, R.- Remisión completa (paciente vivo), F.- falla al tratamiento y progresión tumoral, IPI.- Índice Pronóstico Internacional. (*) se recibió segunda muestra, después de tratamiento, (°) Tx con prednisona, leucocitosis.

b. Análisis del porcentaje de recuperación celular

Del total de las 32 muestras de médula ósea de pacientes con LDCG-B recibidas, 4 de ellas (LDCG-B 31, 37, 38 y 44), no se pudieron procesar para la obtención de las diferentes poblaciones hematopoyéticas debido al escaso número de CMN obtenidas. Diez y siete de las muestras de LDCG-B fueron procesadas para la obtención de la Población II y 11 muestras para la obtención de la Población III (Tabla III). El porcentaje de recuperación de células nucleadas post-columna para la Población II de las muestras de médula ósea normal fue de 2.0% (0.8-5.6) y para LDCG-B fue de 2.7% (0.6-12.0) (Tabla III). Durante el procesamiento para la selección de la Población III el porcentaje de recuperación de células nucleadas post-columna de las muestras de médula ósea normal fue de 2.0% (0.8-5.6) y para LDCG-B fue de 1.2% (0.1-5.3) (Tabla IV). Para el caso de las muestras de SPM el porcentaje de recuperación de células nucleadas post-columna para la Población I fue de 2.1% y para la Población III de 1.6% (Tabla V).

c. Porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34+

Se realizaron experimentos de IH para el antígeno CD34, en cada una de las muestras, con la finalidad de cuantificar el porcentaje de células CD34+ después de la separación por la columna. Se contaron de 200 a 300 células para obtener el porcentaje de células positivas en cada muestra y obtener de esta manera el número de veces que se estaba enriqueciendo la muestra en progenitores hematopoyéticos CD34+ después de realizar la selección negativa.

El porcentaje de células CD34+ durante la selección negativa para la Población II fue de 0.9% (0.6-1.2) pre-columna y de 21.1% (8.0-41.3) post-columna para las muestras de médula ósea normal. Para el caso de las muestras de pacientes fue de 7.9% (0-

38.0) y 58.3% (29.0-86.0) respectivamente, obteniéndose enriquecimientos de 23.4 veces para médula ósea normal y de 7.4 veces para linfoma (Tabla III).

El porcentaje de células CD34+, durante la selección negativa para la Población III fue de 2.2% (1.0-3.0) pre-columna y de 70.0% (52.0-70.0) post-columna para médula ósea normal. Para el caso de la muestras con linfoma fue de 3.0% (1.0-8.0) y 84.0% (74.0-94.0) respectivamente, obteniéndose enriquecimientos celulares de 31.8 veces para médula ósea normal y de 28 veces para linfoma. (Tabla IV)

En lo que se refiere a el porcentaje de células CD34+ en las muestras de SPM, fue de 1.9% (0.4-3.3) pre-columna y de 47.0% (34.0-61.0) post-columna, esto para la Población II con enriquecimiento celular de 24.7 veces. Para la Población III también de SPM, las células CD34+ correspondieron al 0.4% (0.1-1.7%) pre-columna y de 74% (59.0-91.0) post-columna con enriquecimiento celular de 185 veces (Tabla V).

TABLA III

PORCENTAJE DE CÉLULAS CD34+ EN LA POBLACION II DE MÉDULA ÓSEA NORMAL Y DE PACIENTES CON LDCG-B

	<u>% células nucleadas</u>		<u>% células CD34+</u>	
	Pre-Columna	Post-Columna	Pre-Columna	Post-Columna
MOn (n=5)	100	2.0 (0.8-5.6)	0.9 (0.6-1.2)	21.1 (8.0-41.3)
LDCG-B (n=17)	100	2.7 (0.6-12.0)	7.9 (0-38.0)	58.3 (29.0-86.0)

Los resultados representan la media correspondiente al porcentaje de células nucleadas y de células CD34+ en las muestras analizadas, antes (pre-columna) y después (post-columna) de la selección negativa. MOn (médula ósea normal), LDCG-B (linfoma difuso de células grandes tipo B), Población II (células CD34+LIN-).

TABLA IV**PORCENTAJE DE CELULAS CD34+ EN LA POBLACION III DE MÉDULA ÓSEA
NORMAL Y DE PACIENTES CON LDCG-B**

	<u>% células nucleadas</u>		<u>% células CD34+</u>	
	Pre-Columna	Post-Columna	Pre-Columna	Post-Columna
MOn (n=5)	100	2.0 (0.8-5.6)	2.2 (1.0-3.0)	70.0 (52.0-70.0)
LDCG-B (n=11)	100	1.2 (0.1-5.3)	3.0 (1.0-8.0)	84.0 (74.0-94.0)

Los resultados representan la media correspondiente al porcentaje de células nucleadas y de células CD34+ en las muestras analizadas, antes (pre-columna) y después (post-columna) de la selección negativa. MOn (médula ósea normal), LDCG-B (linfoma difuso de células grandes tipo B), Población III (células CD34+CD38-LIN-).

TABLA V

**PORCENTAJE DE CELULAS CD34+ EN POBLACIONES CELULARES DE
MÉDULA ÓSEA NORMAL Y DE SPM**

	<u>% células nucleadas</u>		<u>% células CD34+</u>	
	Pre-Columna	Post-Columna	Pre-Columna	Post-Columna
MOn (n=5)	100	2.0	0.9	21.1
Población II		(0.8-5.6)	(0.6-1.2)	(8.0-41.3)
SPM (n=14)	100	2.1	1.9	47
Población II			(0.4-3.3)	(34.0-61.0)
SPM (n=6)	100	1.6	0.4	74
Población III			(0.1-1.7)	(59.0-91.0)

Los resultados representan la media correspondiente al porcentaje de células nucleadas y de células CD34+ en las muestras analizadas, antes (pre-columna) y después (post-columna) de la selección negativa. MOn (médula ósea normal), SPM (sangre periférica movilizada), Población II (células CD34+LIN-), Población III (células CD34+CD38-LIN-).

d. Análisis de la expresión genética en progenitores hematopoyéticos

Se trabajó con RNA proveniente de las tres diferentes Poblaciones celulares I, II y III descritas anteriormente, así como de la línea celular RAJI (Figura I). Esta última proviene de un linfoma de Burkitt y sobrepresa los genes *c-myc*, *bcl-2* y *p53*, por lo que fue utilizada para la estandarización de los experimentos de RT-PCR. Para iniciar con los experimentos de RT-PCR Multiplex fue necesario estandarizar la temperatura de alineamiento adecuada para la amplificación de los diferentes productos (*GAPDH*, *ice*, *c-myc*, *bcl-2* y *p53*). Se probaron dos temperaturas de alineamiento (58°C y 57°C), encontrando que 57°C fue la temperatura mas adecuada para la amplificación (Figura II). Posteriormente con el RNA proveniente de la línea celular Raji se realizó la estandarización de la síntesis de cDNA, así como la PCR Multiplex con las temperaturas previamente establecidas (Figura III). Una vez establecidas la condiciones para la RT-PCR Multiplex, se analizaron muestras de la Población I, Población II y Población III de pacientes y muestras normales. En la Figuras IV se muestran algunos ejemplos representativos de RT-PCR Multiplex de médula ósea normal y de SPM y en la Figura V se muestran experimentos con células de pacientes.

A cada una de las muestras se les realizó un análisis densitométrico para obtener un análisis semi-cuantitativo. Al valor obtenido para la banda de *GADPH* en cada muestra se le consideró como el 100% y el valor obtenido para cada uno de los diferentes genes (*ice*, *c-myc*, *bcl-2* y *p53*), fue comparado con su correspondiente *GADPH*. En la Tabla VI se muestran agrupadas las medias de los porcentajes de expresión genética de *ice*, *c-myc*, *bcl-2* y *p53* en las diferentes poblaciones hematopoyéticas analizadas en médula ósea normal y en LDCG-B. A continuación se describen los resultados obtenidos para cada uno de los genes:

Caspasa 1 (ice)

En lo que se refiere a la expresión del gen *ice* se detectó que la Población I de SPM presentó mayores niveles de expresión genética (56 ± 33) que la misma Población I tanto de médula ósea normal (22 ± 16) como de LDCG-B (31 ± 24). No se detectaron cambios significativos en la expresión de dicho gen entre la Población II normal (33 ± 19), de SPM (35 ± 35) y de pacientes (22 ± 26). Para la Población III tampoco se observaron diferencias significativas entre SPM (39 ± 34) y LDCG-B (18 ± 10). De manera general en las tres poblaciones analizadas (I, II y III) la expresión genética de *ice* fue menor en pacientes con LDCG-B que en las muestras normales. (Gráfica 1, Tabla VI).

bcl-2

Una de las principales diferencias encontradas en la expresión de este gen fue en la Población I; ya que las células provenientes de pacientes con LDCG-B presentaron menores porcentajes de expresión de dicho gen (29 ± 18), en comparación con la Población I de médula ósea normal (51 ± 31). Los niveles de expresión entre la Población II de médula ósea normal (54 ± 20), SPM (24 ± 27) y de pacientes (29 ± 25) fueron similares. Para la Población III las diferencias no fueron significativas entre SPM (35 ± 43) y LDCG-B (19 ± 12) (Gráfica 3, Tabla VI).

c-myc

Para el caso del gen *c-myc* la Población I de LDCG-B expresó los menores porcentajes de expresión (11 ± 6) en comparación con la Población I de médula ósea normal (20 ± 10) y de SPM (12 ± 18). Así mismo la Población II de pacientes expresó los porcentajes

de expresión más elevados de este gen (17 ± 13) en comparación con la Población I también de pacientes (11 ± 6), aunque significativamente menores que las mismas poblaciones de médula ósea normal. Dentro de esta población las células provenientes de médula ósea normal expresaron los mayores porcentajes de expresión (38 ± 20) en comparación con LDCG-B (17 ± 13) y con SPM (9 ± 11). Para la Población III no se detectaron diferencias entre SPM (6 ± 6) y LDCG-B (7 ± 3) (Gráfica 2, Tabla VI).

p53

La expresión genética del gen p53 fue similar entre muestras de pacientes y muestras normales, sin embargo se detectaron diferencias entre las diferentes poblaciones celulares obtenidas de la misma fuente (MOn, SPM o LDCG-B). De tal forma que la Población I de médula ósea normal expresó mayores porcentajes de esta molécula (34 ± 11) en comparación con la Población I de SPM (14 ± 15). Para el caso de los pacientes con LDCG-B la Población II expresó mayores porcentajes de p53 (40 ± 46) que la Población I también de pacientes (20 ± 29). En el caso de la Población II de médula ósea normal, esta presentó mayores niveles de expresión de p53 (47 ± 16) que la misma Población II de SPM (12 ± 8). Para la Población III las diferencias no fueron significativas entre SPM (13 ± 13) y LDCG-B (6 ± 6) (Gráfica 4, Tabla VI).

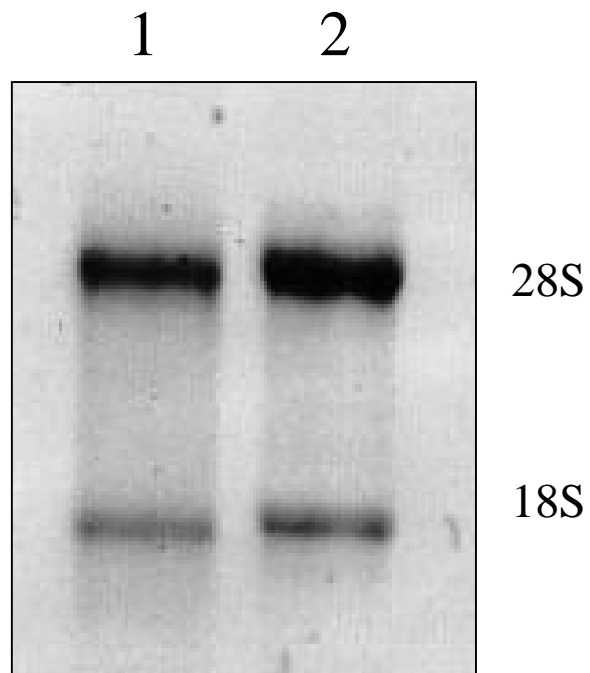


Figura I. Extracción de RNA a partir de CMN y células CD34+LIN- de pacientes con LDCG-B. 1.- 300 ng de RNA de la Población I (10×10^6), 2.- 600 ng de RNA de la Población II (1×10^6).

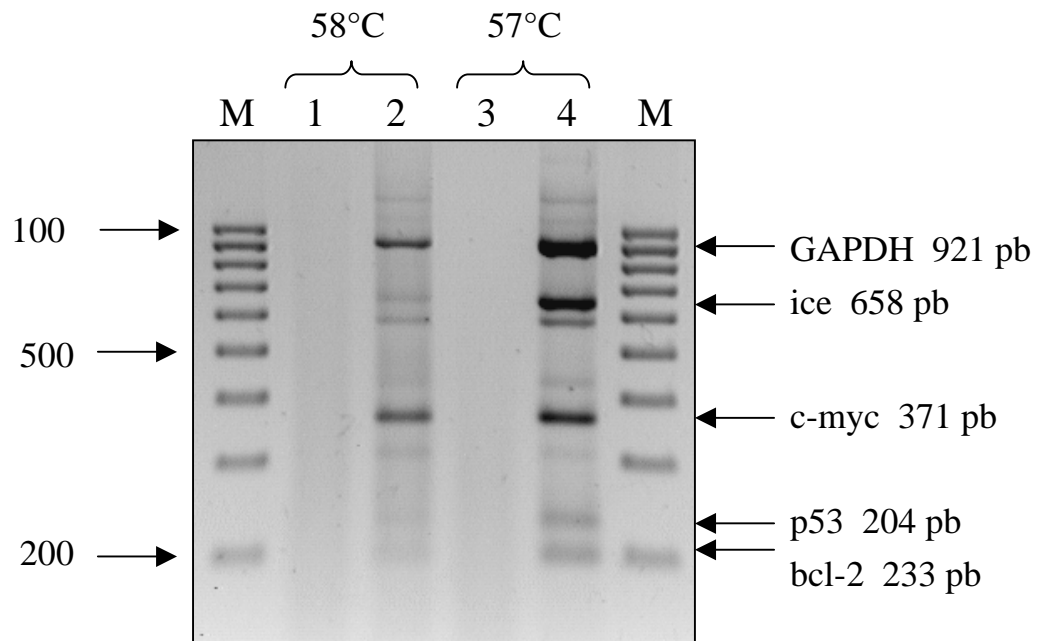


Figura II. PCR multiplex utilizando DNA control y diferentes temperaturas de alineamiento. M.- marcadores de peso molecular, 1 y 3.- controles sin DNA, 2 y 4.- DNA control.

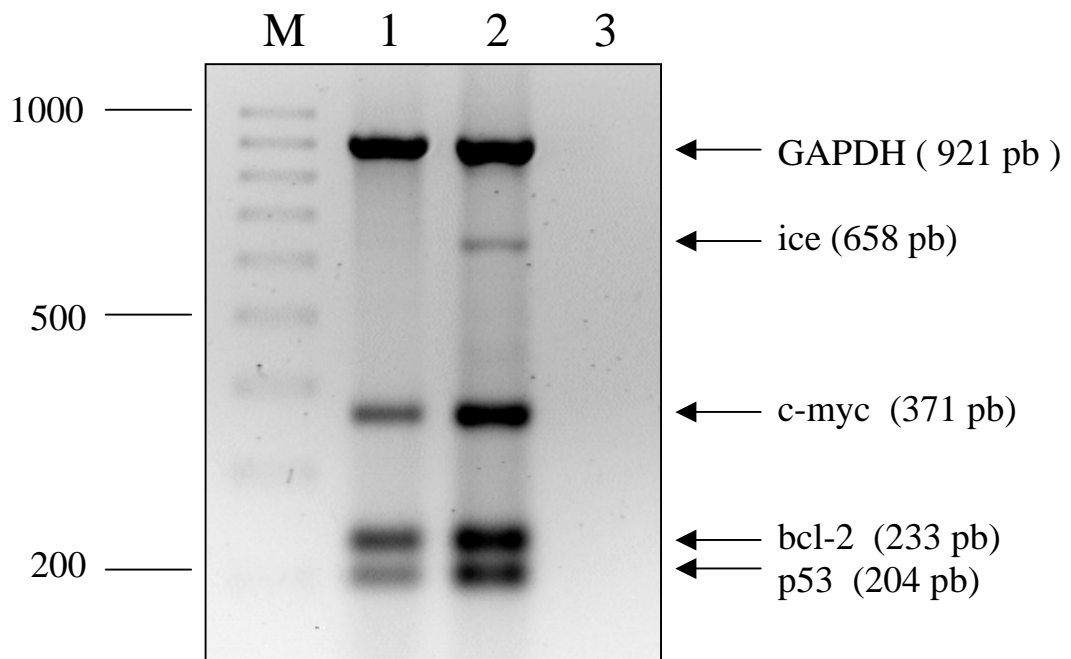


Figura III. RT-PCR multiplex realizado con RNA proveniente de la línea celular Raji.

M.- marcadores de peso molecular, 1.- 5µl de cDNA, 2.- 10µl de cDNA, 3.- Control negativo sin RNA.

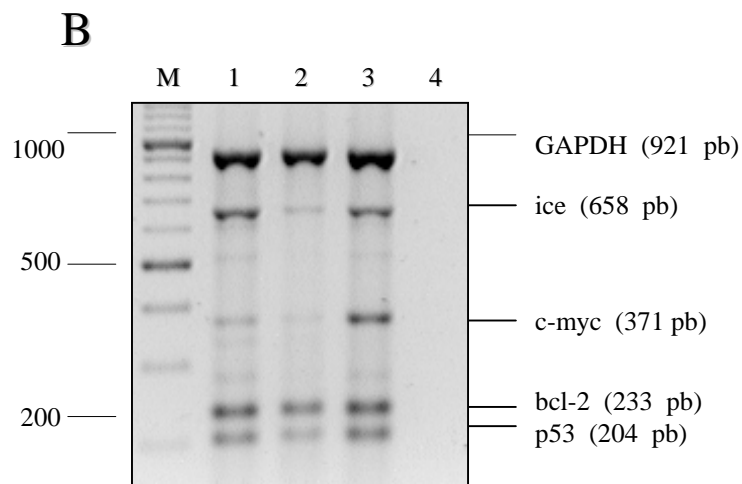
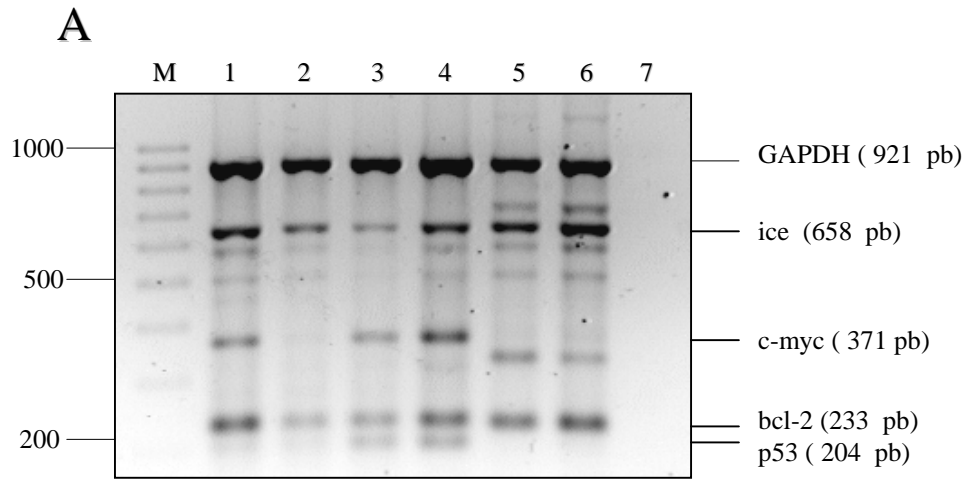


Figura IV. RT-PCR Múltiple de muestras de médula ósea normal y de sangre periférica movilizada. A) 1.- SPM 22 Población I, 2.- SPM 20 Población I, 3.- SPM 20 Población II, 4.- MOn Población II, 5.- SPM Población II, 6.- SPM Población III, 7.- Control sin RNA. B) 1.- MOn Población I, 2.- MOn Población I, 3.- MOn Población II, 4.- Control sin RNA.

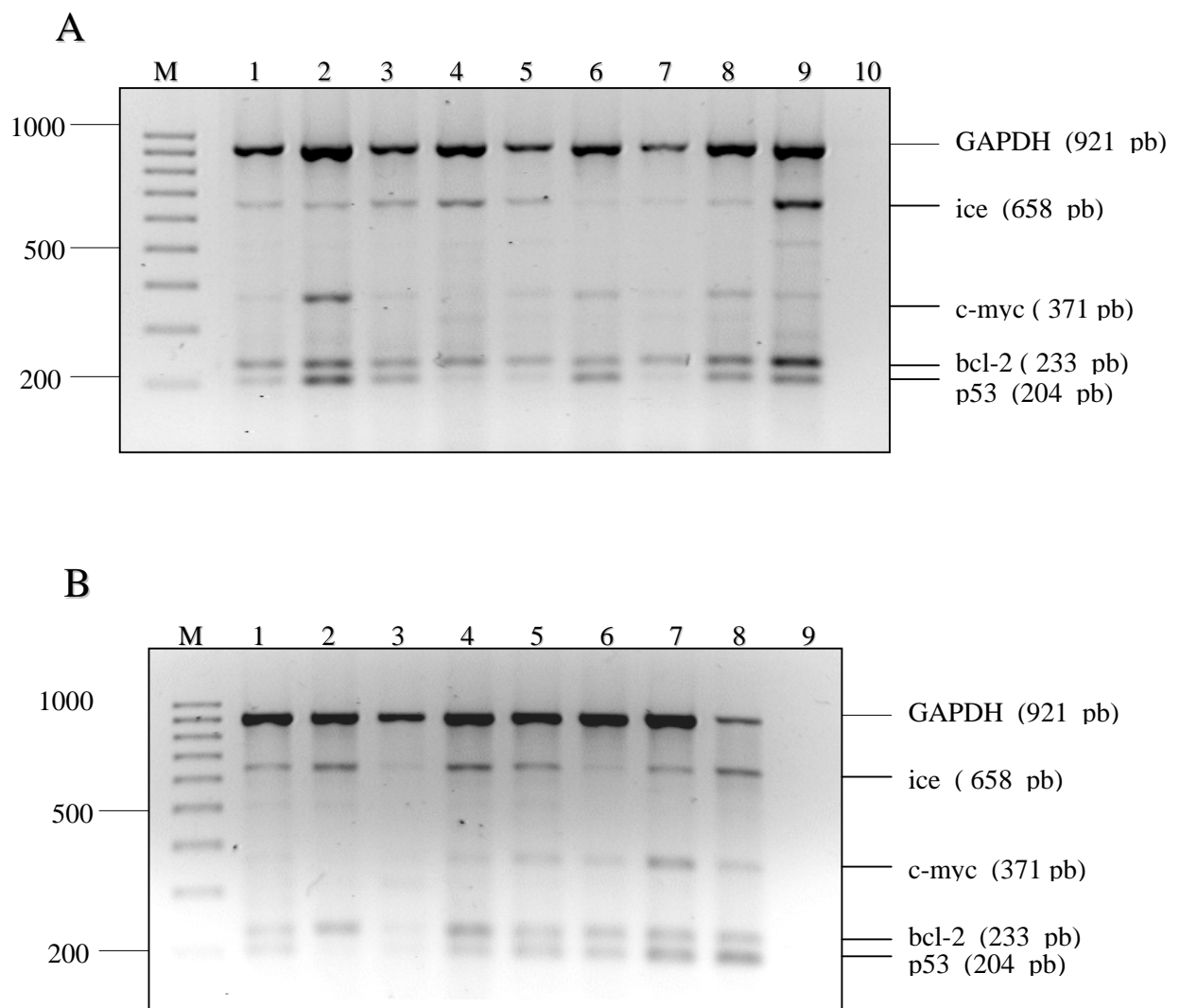


Figura V. RT-PCR Múltiple de muestras de médula ósea de pacientes. A) 1.- LDCG-B 28 Población I, 2.- LDCG-B 28 Población II, 3.- LDCG-B 25 Población I, 4.- LDCG-B 25 Población III, 5.- LDCG-B 20 Población I, 6.- LDCG-B 20 Población II, 7.- LDCG-B 21 Población I, 8.- LDCG-B 21 Población II, 9.- LDCG-B 29 Población I, 10.- Control sin RNA. B) 1.- LDCG-B 19 Población I, 2.- LDCG-B 15 Población I, 3.- LDCG-B 17 Población I, 4.- LDCG-B 18 Población I, 5.- LDCG-B 19 Población II, 6.- LDCG-B 15

Población II, 7.- LDCG-B 17 Población II, 8.- LDCG-B 18 Población II, 9.- Control sin RNA.

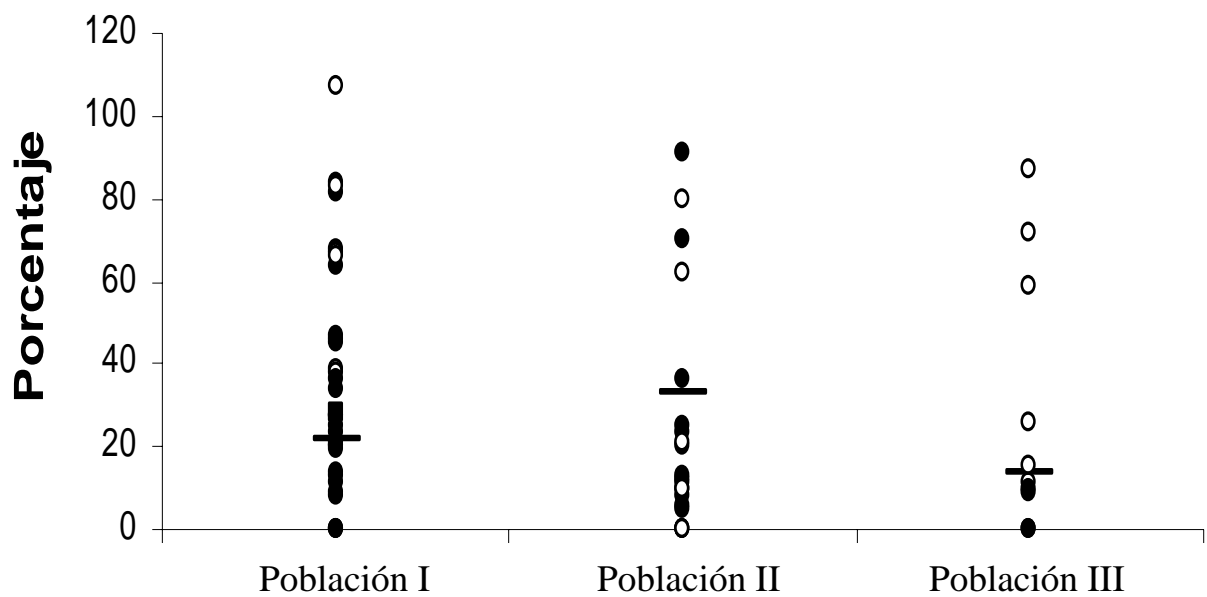
TABLA VI. EXPRESIÓN GENÉTICA DE ICE, C-MYC, BCL-2 Y P53 EN DIFERENTES POBLACIONES HEMATOPOYÉTICAS

<i>POBLACIÓN CELULAR</i>	<i>ice</i>	<i>bcl-2</i>	<i>c-myc</i>	<i>p53</i>
POBLACIÓN I				
MOn (n=5)	22 ± 16 *	51 ± 31 *	20 ± 10	34 ± 11 *
SPM (n=9)	56 ± 33 *	35 ± 27	12 ± 18	14 ± 15 *
LDCG-B (n=24)	31 ± 24 *	29 ± 18 *	11 ± 6 *	20 ± 29 *
POBLACIÓN II				
MOn (n=6)	33 ± 19	54 ± 20	38 ± 20 *	47 ± 16 *
SPM (n=5)	35 ± 35	24 ± 27	9 ± 11 *	12 ± 8 *
LDCG-B (n=15)	22 ± 26	29 ± 25	17 ± 13 *	40 ± 46 *
POBLACIÓN III				
MOn (n=7)	39 ± 34	35 ± 43	6 ± 6	13 ± 13
LDCG-B (n=3)	18 ± 10	19 ± 12	7 ± 3	6 ± 6

Los valores están representados como porcentaje, de acuerdo a los valores obtenidos en el análisis densitométrico y comparados con el correspondiente valor de GADPH para cada muestra. * Indica diferencia estadística significativa. Población I.- CMN, Población II.- células

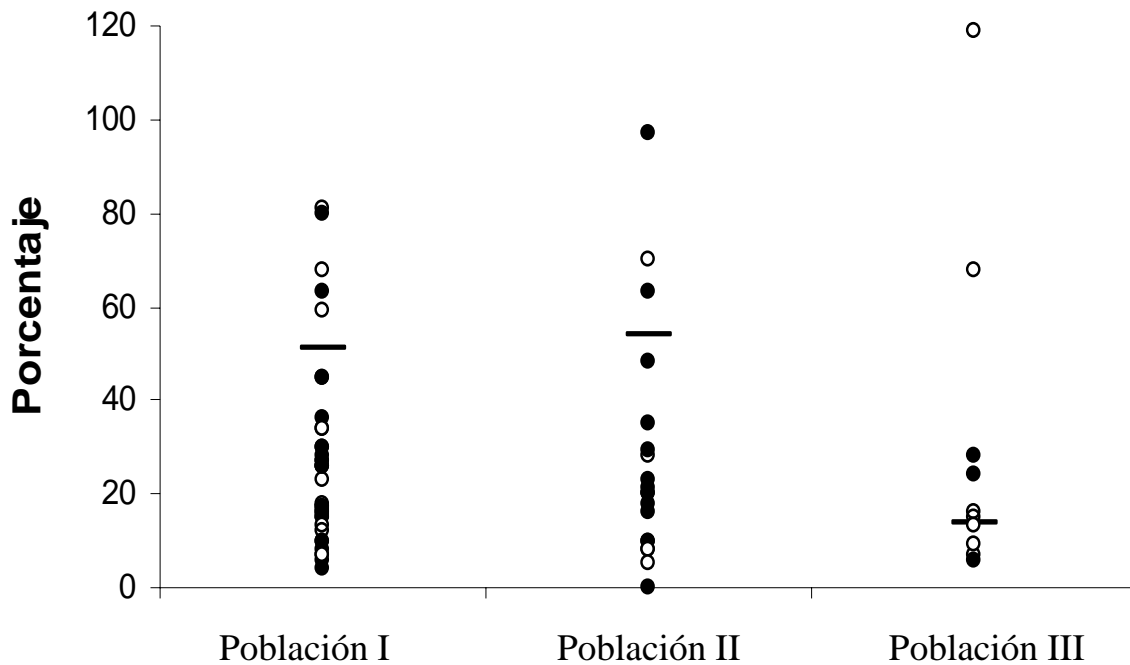
CD34+LIN-, Población III.- células CD34+CD38-LIN-, MOn- medula ósea normal, SPM.- sangre periférica movilizada, LDCG-B.- linfoma difuso de células grandes tipo B.

EXPRESIÓN GENÉTICA DE ICE EN POBLACIONES CELULARES DE MEDULA OSEA



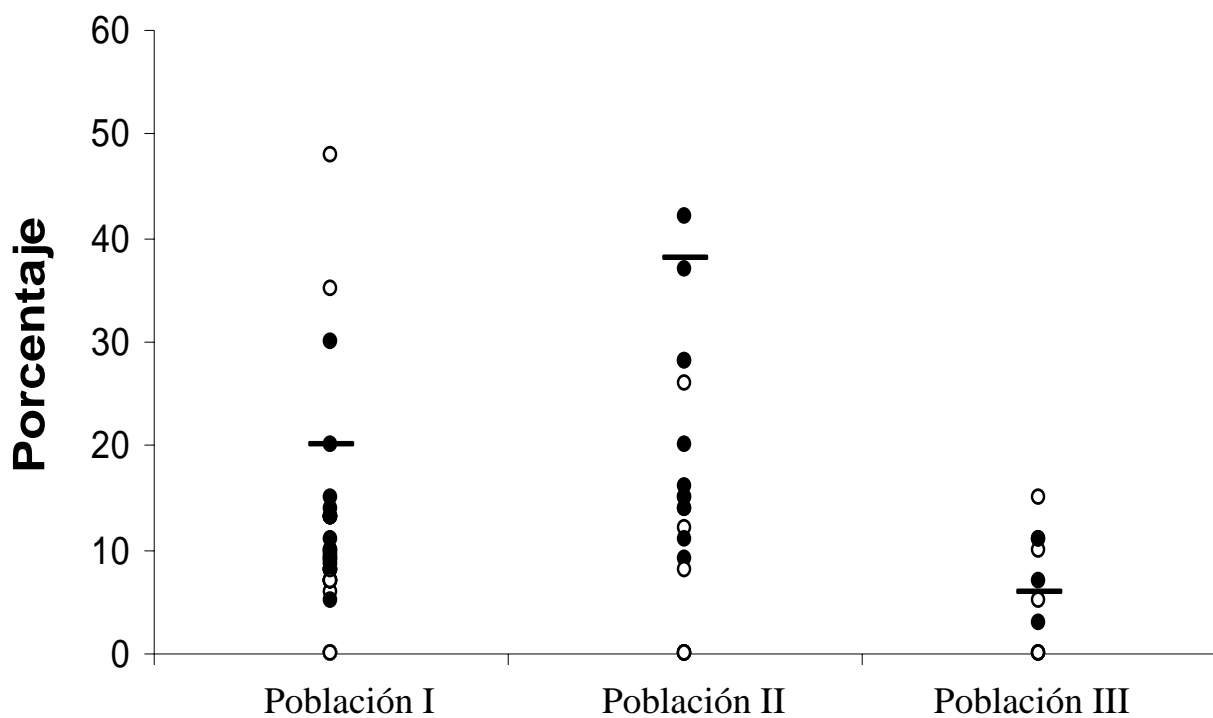
Gráfica 1. Expresión genética de ice en diferentes poblaciones hematopoyéticas. Los resultados normalizados se expresan como porcentaje de expresión, de acuerdo con los valores obtenidos en el análisis densitométrico. ● LDCG-B, ○ SPM, sangre periférica movilizada, — promedio de medula ósea normal. Población I.- CMN, Población II.- células CD34+LIN-, Población III.- células CD34+CD38-LIN-.

EXPRESIÓN GENÉTICA DE BCL-2 EN POBLACIONES CELULARES DE MEDULA OSEA



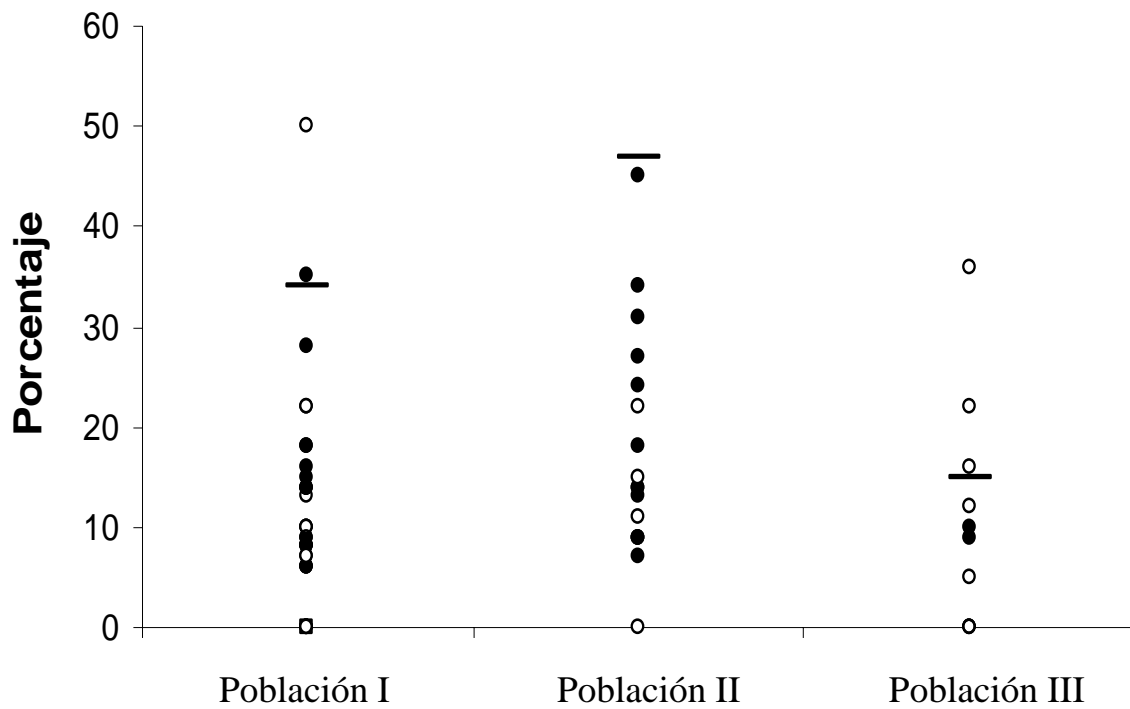
Gráfica 2. Expresión genética de bcl-2 en diferentes poblaciones hematopoyéticas. Los resultados normalizados se expresan como porcentaje de expresión, de acuerdo con los valores obtenidos en el análisis densitométrico. ● LDCG-B, ○ SPM, sangre periférica movilizada, — promedio de medula ósea normal. Población I.- CMN, Población II.- células CD34+LIN-, Población III.- células CD34+CD38-LIN-.

EXPRESIÓN GENÉTICA DE C-MYC EN POBLACIONES CELULARES DE MEDULA OSEA



Gráfica 3. Expresión genética de c-myc en diferentes poblaciones hematopoyéticas. Los resultados normalizados se expresan como porcentaje de expresión, de acuerdo con los valores obtenidos en el análisis densitométrico. ● LDCG-B, ○ SPM, sangre periférica movilizada, — promedio de medula ósea normal. Población I.- CMN, Población II.- células CD34+LIN-, Población III.- células CD34+CD38-LIN-.

EXPRESIÓN GENÉTICA DE P53 EN POBLACIONES CELULARES DE MEDULA OSEA



Gráfica 4. Expresión genética de p53 en diferentes poblaciones hematopoyéticas. Los resultados normalizados se expresan como porcentaje de expresión, de acuerdo con los valores obtenidos en el análisis densitométrico. ● LDCG-B, ○ SPM, sangre periférica movilizada, — promedio de medula ósea normal. Población I.- CMN, Población II.- células CD34+LIN-, Población III.- células CD34+CD38-LIN-.

e. Análisis de la expresión de proteínas en progenitores hematopoyéticos

Se llevaron a cabo experimentos de IH para las proteínas P53, C-MYC, ICE y BCL-2 en diferentes progenitores hematopoyéticos normales y de pacientes con LDCG-B. Para todos los experimentos se utilizó como control positivo de expresión para las cuatro proteínas analizadas, la línea celular Raji y como control negativo se utilizó la línea celular 32D. A continuación se describen los resultados obtenidos:

ICE: los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de la proteína ICE en la Población I de médula ósea normal se observó sólo en el 14% de las muestras, mientras que el 50% de la Población II expresó dicha proteína. En lo que se refiere a los pacientes con LDCG-B para las Poblaciones I y II la expresión de ICE fue mayor que en las mismas poblaciones normales (25% y 73% respectivamente). (Gráfica 5 y Tabla VII).

BCL-2: en el análisis de la proteína BCL-2, su expresión se observó con una mayor proporción que la proteína ICE en las muestras normales, ya que el 50% de la Población I y el 100% de la Población II fueron positivas para BCL-2. También se observó una mayor proporción de expresión en las muestras de pacientes de la Población I en comparación con muestras normales (80% vs 50% respectivamente). Para la Población II tanto las muestras normales como las muestras de pacientes se expresaron en 100%. (Gráfica 6 y Tabla VI).

C-MYC: los resultados obtenidos para el análisis de C-MYC demostraron que la expresión de este gen está restringida a un pequeño número de muestras en la Población I

normal (8%) mientras que para las Poblaciones II y III la expresión fue del 83% y 100% respectivamente. Para el caso de las muestras de pacientes, se observó disminución en la expresión de este gen de acuerdo al estado de maduración celular, siendo mayor en las células menos maduras. De ahí que se observará expresión del 100% en la Población III, 78% en la Población II y 26% en la Población I. (Gráfica 7 y Tabla VII).

P53: en el análisis de la proteína P53 se observó el mismo patrón de expresión mostrado para C-MYC, ya que el 100% de la Población III normal expresó 100% y prácticamente toda la Población I fue negativa. Para el caso de los pacientes se observó una ligera disminución en la Población III (86%), y también se observó el patrón de disminución de la expresión en las poblaciones más maduras, siendo del 60% para la Población II y del 27% para la Población I. Es importante recalcar que los niveles de expresión de P53 nunca fueron tan bajos como en la Población I normal (27% VS 0%). (Gráfica 8 y Tabla VII).

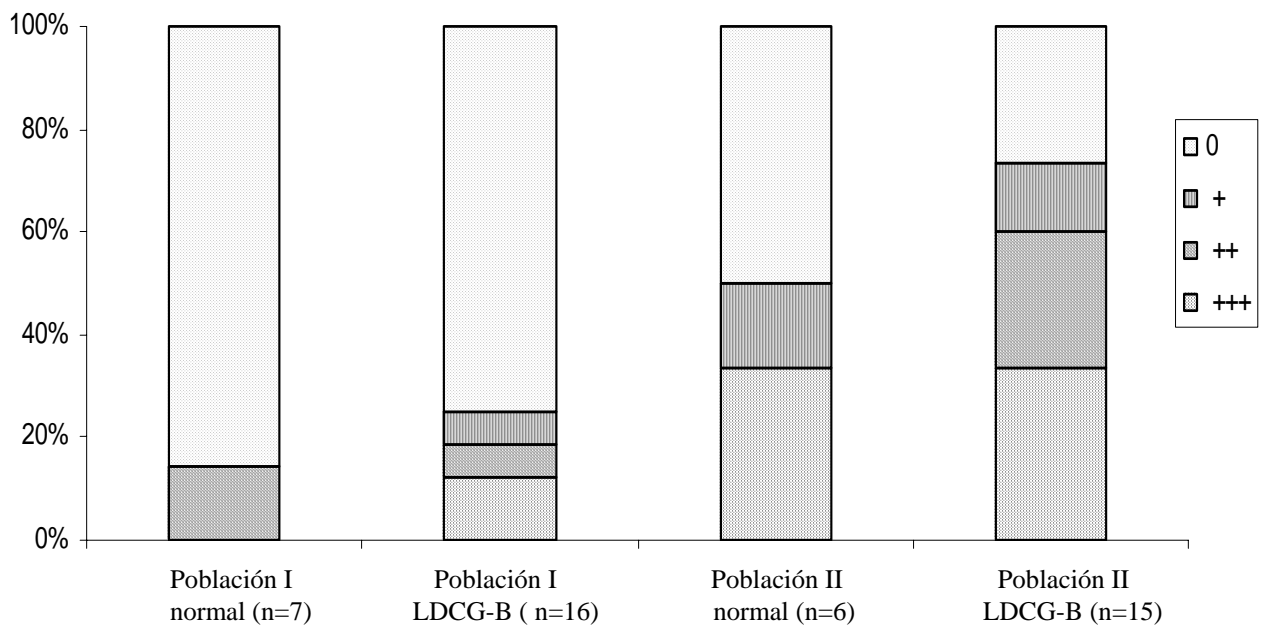
TABLA VII. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE ICE, C-MYC, BCL-2 Y P53 EN DIFERENTES POBLACIONES HEMATOPOYÉTICAS

II	POBLACIÓN I		POBLACIÓN II		POBLACIÓN III		POBLACIÓN IV	
	NORMAL	LDCG-B	NORMAL	LDCG-B	NORMAL	LDCG-B	NORMAL	LDCG-B
ICE	+	14	25	50	73	NR	NR	
	-	86	75	50	27	NR	NR	
		n=7	n=16	n=6	n=15			
BCL-2	+	50	80	100	100	NR	NR	
	-	50	20	0	0	NR	NR	
		n=4	n=20	n=4	n=17			
C-MYC	+	8	26	83	78	100	100	
	-	92	74	17	22	0	0	
		n=12	n=13	n=6	n=9	n=3	n=4	
P53	+	0	27	37	60	100	86	
	-	100	73	63	40	0	14	
		n=3	n=22	n=8	n=10	n=3	n=7	

Los resultados son expresados como porcentaje total de muestras que fueron positivas para cada una de las proteínas analizadas. +) muestras que presentaron células positivas por arriba del 25%, -) muestras negativas. LDCG-B.- Linfoma Difuso de Células Grandes tipo B, n.- número

de muestras. NR.- no realizado. Población I.- CMN, Población II.- células CD34+LIN-, Población III.- células CD34+CD38-LIN-.

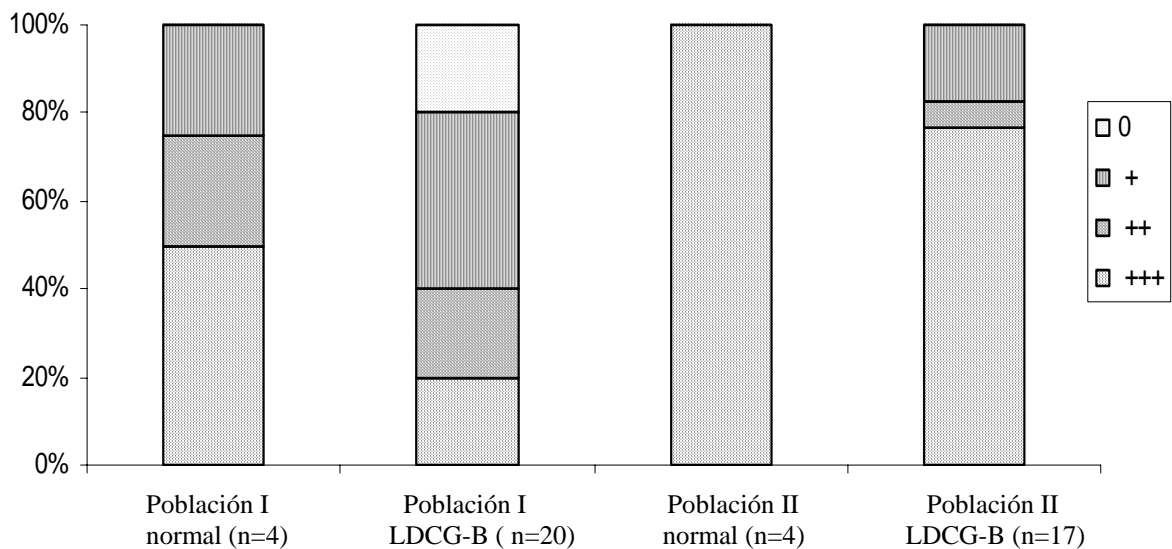
INMUNOHISTOQUÍMICA PARA ICE EN POBLACIONES CELULARES DE MEDULA OSEA



Gráfica 5. Inmunohistoquímica para ICE en diferentes poblaciones celulares de médula ósea de pacientes con LDCG-B. Criterios para la agrupación (Koduru et. Al. 1997): Negativo.- ninguna célula teñida, +) 10% a 25% células positivas, ++) 25% a 50% células positivas, +++)) más de 50% de células positivas. LDCG-B.- Linfoma Difuso de Células

Grandes tipo B. Población I.- CMN, Población II.- células CD34+LIN-, Población III.- células CD34+CD38-LIN-.

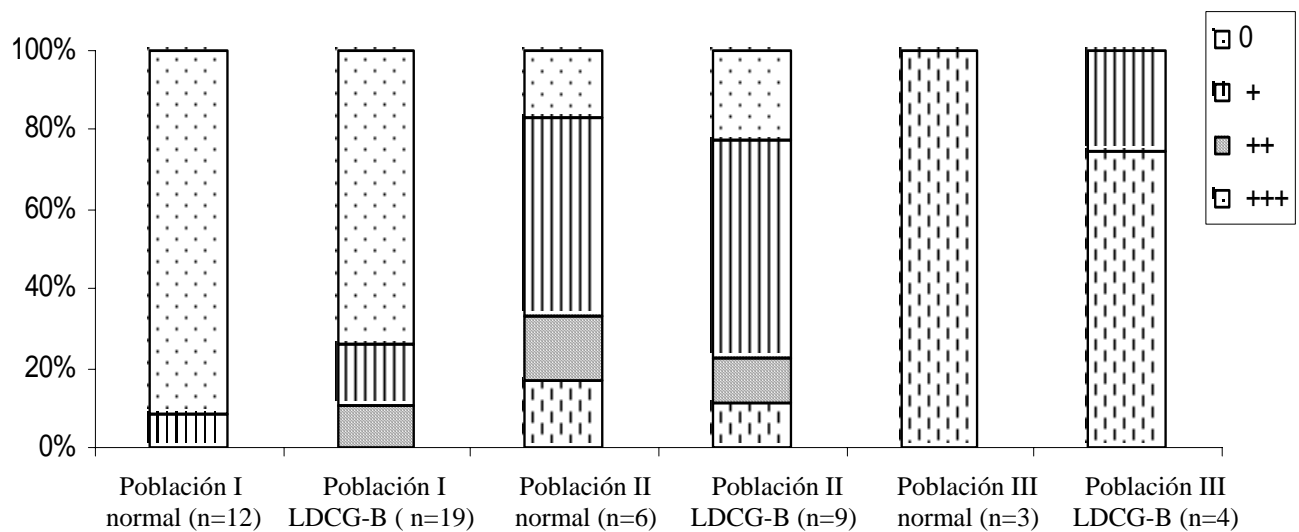
INMUNOHISTOQUÍMICA PARA BCL-2 EN POBLACIONES CELULARES DE MEDULA OSEA



Gráfica 6. Inmunohistoquímica para BCL-2 en diferentes poblaciones celulares de médula ósea de pacientes con LDCG-B. Criterios para la agrupación (Koduru et. Al. 1997): Negativo.- ninguna célula teñida, +) 10% a 25% células positivas, ++) 25% a 50% células positivas, +++)) más de 50% de células positivas. LDCG-B.- Linfoma Difuso de Células

Grandes tipo B. Población I.- CMN, Población II.- células CD34+LIN-, Población III.- células CD34+CD38-LIN-.

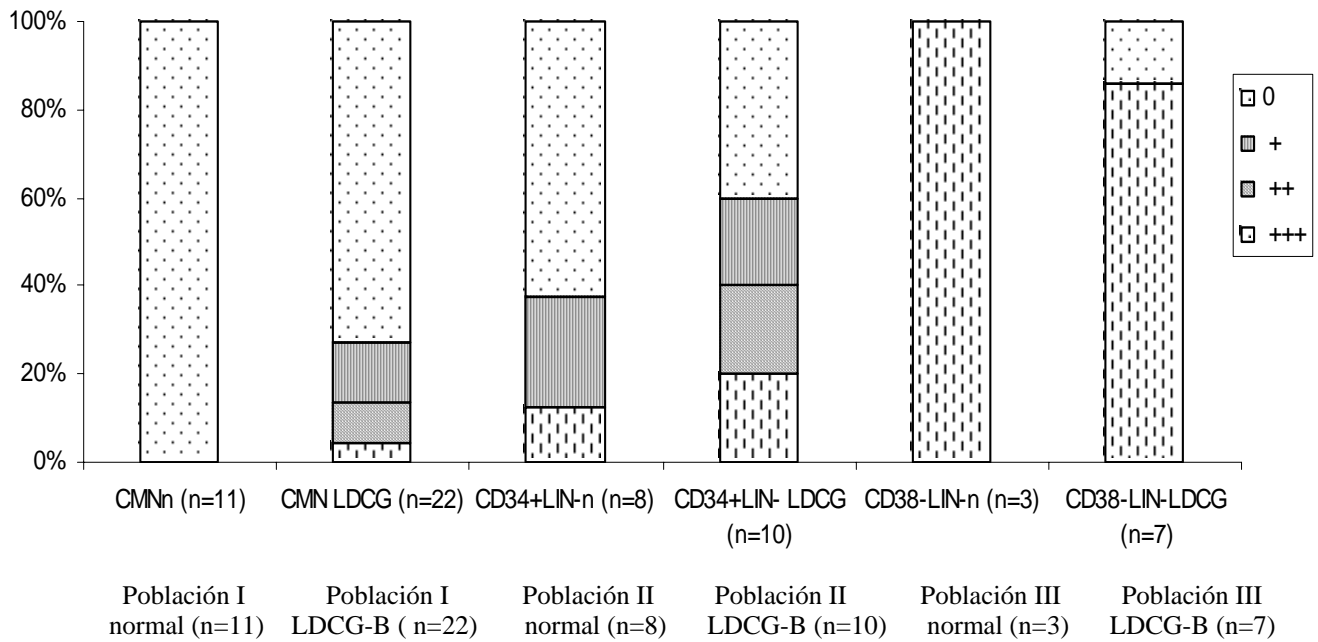
INMUNOHISTOQUÍMICA PARA C-MYC EN POBLACIONES CELULARES DE MEDULA OSEA



Gráfica 7. Inmunohistoquímica para C-MYC en diferentes poblaciones celulares de médula ósea de pacientes con LDCG-B. Criterios para la agrupación (Koduru et. Al. 1997):
 Negativo.- ninguna célula teñida, +) 10% a 25% células positivas, ++) 25% a 50% células

positivas, +++)) más de 50% de células positivas. LDCG-B.- Linfoma Difuso de Células Grandes tipo B. Población I.- CMN, Población II.- células CD34+LIN-, Población III.- células CD34+CD38-LIN-.

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA P53 EN POBLACIONES CELULARES DE MEDULA OSEA



Gráfica 8. Inmunohistoquímica para P53 en diferentes poblaciones celulares de médula ósea de pacientes con LDCG-B. Criterios para la agrupación (Koduru et. Al. 1997): Negativo.- ninguna célula teñida, +) 10% a 25% células positivas, ++) 25% a 50% células positivas, +++)) más de 50% de células positivas. LDCG-B.- Linfoma Difuso de Células Grandes tipo B. Población I.- CMN, Población II.- células CD34+LIN-, Población III.- células CD34+CD38-LIN-.

X. DISCUSIÓN

El sistema hematopoyético se encuentra alterado en una gran variedad de neoplasias hematológicas, incluyendo a los síndromes mielodisplásicos y a los diversos tipos de leucemias (Flores-Figueroa E, 1999, Espinoza-Hernández L, 2001). En el caso del LDCG-B, se considera que la médula ósea en esta patología es normal, siempre y cuando no exista infiltración de células malignas. Sin embargo, gracias a los trabajos de Huerta-Zepeda y cols. en el 2000 y el de Martínez-Jaramillo y cols. en el 2004, en donde se caracterizan funcionalmente diferentes poblaciones celulares de médula ósea de pacientes con LDCG-B, se obtuvo evidencia de que existen alteraciones funcionales, al menos *in vitro*, tanto a nivel de células hematopoyéticas como estromales.

Ya que aún existe una gran variedad de preguntas acerca de la integridad funcional y molecular de las células de la médula ósea de pacientes con LDCG-B, el presente estudio pretendió extender esta línea de investigación, analizando molecularmente a diferentes poblaciones celulares presentes en la médula ósea de dichos pacientes, a través del análisis de genes claves en la fisiología de células hematopoyéticas como son: c-myc, involucrado en proliferación; p53, un gen supresor de tumor y regulador del ciclo celular; ice, involucrado en la progresión de la apoptosis; y bcl-2, un gen anti-apoptótico. El estudio de

estos genes ha sido exhaustivo en células provenientes de ganglios linfáticos de pacientes con linfoma; sin embargo, estos mismos genes no han sido analizados en la médula ósea de pacientes con LDCG-B y hasta el momento no se conoce el estatus en el que se encuentran.

Para llevar a cabo el presente estudio fue necesario separar las diferentes poblaciones hematopoyéticas: CMN (Población I), CD34+LIN- (Población II), CD34+CD38-LIN- (Población III) de la médula ósea normal y de pacientes con LDCG-B a través de un procedimiento de selección negativa. Este método de selección ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio para el análisis de diversas neoplasias hematopoyéticas y sangre de cordón umbilical (Flores-Guzmán, 2005, Chavez-González, 2004), demostrando ser un método confiable y reproducible para el análisis de poblaciones celulares enriquecidas. Los porcentajes de células CD34+ después de la selección en la Población II de pacientes fue de 58% y para el caso de la Población III fue de 84%. Como se puede observar estos resultados indican que las poblaciones celulares con las que se trabajó no fueron poblaciones puras, sin embargo son poblaciones enriquecidas por arriba del 50% en células hematopoyéticas primitivas. Es importante señalar que ambas poblaciones carecen en su mayoría de células maduras, ya que durante el procedimiento de selección se realizó la eliminación de células con marcadores de linaje en su superficie; por lo que los fenómenos que se observaron pueden ser atribuidos directamente a poblaciones celulares primitivas presentes en la médula ósea de los pacientes (Flores-Guzmán, 2005).

Uno de los genes analizados en este estudio fue *ice*, el cual produce una proteasa de cisteínas que pertenece a la familia de las caspasas, siendo considerada dentro del grupo de las caspasas iniciadoras de apoptosis (Strasser A et al. 2000). Se ha reportado que las células de SPM sufren más apoptosis en comparación con el mismo tipo celular en médula ósea (Steidl et. al. 2002). Es posible que en las muestras de SPM que analizamos estemos observando el mismo fenómeno, ya que detectamos mayores niveles de expresión

genética de ice en la Población I de SPM en comparación con la Población I de médula ósea normal y de LDCG-B. De manera contraria en las tres poblaciones analizadas (I, II y III) la expresión genética de ice fue menor en pacientes con LDCG-B que en las muestras normales. Sin embargo en lo que se refiere a la expresión de la proteína encontramos que la Población I y la Población II de pacientes mostraron mayor expresión ICE en comparación con médula ósea normal. Por el momento desconocemos si la disminución de la expresión de ICE se verá reflejada en una disminución en los niveles de apoptosis en células provenientes de médula ósea de pacientes.

El gen c-myc es considerado como una pieza clave en la regulación de la proliferación y diferenciación, el arresto celular, así como en la inducción de apoptosis (Prendergas GC, 1999). Los niveles de expresión genética más elevados de c-myc los detectamos en la Población II de médula ósea normal, esto correlaciona con el alto índice de proliferación de esta reportado para dicha población celular. Es interesante que en este estudio hayamos detectamos disminución de la expresión genética de c-myc tanto en las Poblaciones I y II de LDCG-B en comparación con médula ósea normal, teniendo los menores niveles de expresión en la Población III. En el caso de la expresión de proteínas la disminución no fue significativa. Resulta interesante observar disminución en la expresión de este gen en muestras de médula ósea provenientes de pacientes con LDCG-B, cuando el desarrollo de esta misma patología en ganglios linfáticos y en otros tipos de Linfoma como el de Burkitt, están asociadas con un aumento en la expresión de este gen (Boxer ML y Dang VC, 2001). Sin embargo, se sabe que el Linfoma Folicular puede transformarse hacia un subtipo de linfoma más agresivo como es el LDCG-B y dicha transformación esta asociada con patrones alternativos de expresión genética. Mientras que un patrón esta asociado con el aumento en la expresión de c-myc y los genes que este regula, el otro patrón se asocia con la disminución de c-myc y los genes que regula (Lossos IS et al, 2002). Como podemos

observar, en base a la expresión genética de c-myc se está teniendo un patrón característico de comportamiento de un tumor, lo cual nos habla del papel crucial que puede jugar este gen dentro de la generación de LDCG-B no solamente por el aumento en su expresión, sino también por su disminución.

Recientemente se han desarrollado investigaciones en las que se describe el papel de c-myc en el desarrollo del sistema hematopoyético normal y leucémico (Hoffman B et al, 2002), así como los mecanismos por los cuales participa en los fenómenos apoptóticos (Boxer ML y Dang VC, 2001). Dentro de este último mecanismo se sabe que c-myc es capaz de inducir apoptosis por las vías de Fas/CD95 y TNF en el sistema hematopoyético (Hoffman B et al, 2002). Por otro lado, Plumas y cols. 1998, han descrito que las células B tumorales provenientes de Linfomas No-Hodgkin, incluyendo al subtipo de LDCG-B, son resistentes a la apoptosis mediada por Fas/CD95 (Plumas J et al, 1998). El que tanto la Población I como la II de médula ósea de pacientes presentaran disminución en la expresión genética de c-myc podría sugerir la presencia en médula ósea de células resistentes a la inducción de apoptosis por la vía de c-myc, dada la evidencia presentada anteriormente de resistencia a apoptosis por células de linfoma. Una posible alternativa para corroborar que efectivamente está disminuyendo la expresión de c-myc sería analizar un gen que se encuentre dentro de la cascada de inducción de apoptosis por c-myc y que sea directamente regulado por este. Un buen candidato sería el gen FADD el cual es una proteína adaptadora de la vía de apoptosis de Fas/CD95 y que además es regulada directamente por c-myc (Boxer ML y Dang VC, 2001).

Las alteraciones que se presentan en el gen bcl-2 son consideradas como las alteraciones primarias para la generación del LDCG-B, y las alteraciones en p53 y en c-myc son consideradas como las alteraciones secundarias (McKeithan TW, 1990). Es importante resaltar que detectamos disminución en la expresión genética de bcl-2 entre la muestras

normales y de pacientes, sin embargo la diferencia fue significativa sólo en la Población I sin observar correlación con la expresión a nivel de proteína, dado que la sobreexpresión de este gen es crucial para la generación de linfomas, debido a las ventajas que le confiere a las células para sobrevivir (Korsmeyer, 1999, Ngan B-Y , 1988).

Para este estudio también analizamos el gen p53 el cual es un supresor de tumor que se encarga de la eliminación de células aberrantes o anormales, de ahí que se le denomine como “guardián del genoma” (Sionov VR y Haupt Y, 1999). Para ésta molécula no se detectaron diferencias a nivel de la expresión genética entre muestras normales y de pacientes. A nivel de proteína en las muestras normales se observó un patrón de disminución de la expresión conforme las células van madurando. Sin embargo en la Población II de pacientes el patrón observado fue de incremento en algunas de las muestras, la cual consiste en una población de progenitores relativamente maduros, con una gran número de células proliferantes in vivo (Szilvassy SJ, 2003). Es posible que al encontrarse p53 aumentado la expresión genética de sus blancos directos también se observe aumentada, un ejemplo sería el gen p21 el cual es un regulador del arresto del ciclo celular, así como el gen bax el cual es el principal inductor de apoptosis por la vía de p53 (Sionov VR, 1999). El análisis de estas moléculas nos permitiría conocer si dichas células están activando los mecanismos de detención del ciclo celular o los de apoptosis. Contrario a lo que nosotros observamos, en patologías hematológicas como los Síndromes Mielodisplásicos, se ha reportado disminución en la expresión de p53 a través de RT-PCR cuantitativa. Lo anterior se ha asociado principalmente con la neutralización de la apoptosis debido a la disminución de dicho gen (Totzke G et al, 2001).

Uno de los principales problemas que encontramos durante el análisis de los resultados fue al momento de tratar de correlacionar los resultados a partir de RNAm con los resultados de expresión de proteínas, dado que muchas veces éstos no coinciden. De hecho a

nivel de proteína, de manera general, las cuatro moléculas analizadas se encontraron más elevadas en las muestras de pacientes. Resulta importante recalcar que en el presente estudio se evaluó de manera cualitativa la presencia de cada proteína en las muestras, obteniendo un panorama de expresión en toda la muestra, no en cada célula. Además ha sido claramente documentado que los mecanismos involucrados en la regulación post- transcripcional y post-traducciona varían dependiendo de cada proteína, así que los niveles de RNAm y proteína no necesariamente correlacionan (Chen G et al, 2002, Nordengren J, et al 1998).

Un punto importante de mencionar es el que se relaciona con la edad de los pacientes incluidos en este estudio. Mientras que todas las muestras de MOn y de SPM fueron obtenidas de donadores de entre 18 – 45 años de edad, los pacientes con linfoma tuvieron un rango mayor de edad, ya que 23 de 32 fueron mayores de 45 años. En este momento no podemos descartar la posibilidad de que las diferencias observadas en el presente estudio sean debidas a la edad de los pacientes, ya que se ha demostrado que pueden ocurrir importantes cambios funcionales y moleculares en células hematopoyéticas como resultado del envejecimiento (Liang Y, et al, 2003). Aunado a lo anterior, las muestras celulares utilizadas en este estudio, provenían de pacientes con parámetros hematológicos normales en sangre periférica (hemoglobina, hematocrito, leucocitos y plaquetas, Tabla I), aún en aquellos que estaban recibiendo tratamiento anti-neoplásico. De todos los pacientes incluidos en este estudio ninguno mostró infiltración neoplásica hacia la médula ósea. Sin embargo, es sabido que la infiltración de células neoplásicas hacia la médula ósea, cuando está presente, no siempre es homogénea en toda la médula del organismo, por lo que existe la posibilidad de que la biopsia (la cual es realizada generalmente en la cresta iliaca), aporte un resultado falso negativo (Gómez, 2002). En este momento no podemos descartar la posibilidad de que existieran células malignas en la médula ósea de los pacientes estudiados, las cuales pasaron desapercibidas en el estudio morfológico.

Es posible que las deficiencias en los potenciales de proliferación y expansión reportadas previamente en estos pacientes (Martínez-Jaramillo, 2004), pudieran ser explicadas por las alteraciones moleculares aquí detectadas. Es probable que en un futuro los resultados obtenidos puedan ser tomados en cuenta al momento del diagnóstico de los pacientes, así como para la elección de los sujetos candidatos a trasplantes autólogos de médula ósea posterior al tratamiento con quimioterapia.

Es importante recalcar que los resultados obtenidos en médula ósea, pudieran reflejar otra serie de alteraciones distintas a las comúnmente encontradas en ganglios linfáticos de pacientes con LDCG-B. Sin embargo, si estas células con alteraciones en la expresión de genética y de proteínas en moléculas como ICE, C-MYC, P53 y BCL-2 son capaces de llegar a los ganglios linfáticos, serían células que desde la médula ósea presentan cambios que pudieran hacerlas susceptibles para la generación de nuevas alteraciones; dado que en los ganglios linfáticos ocurren una serie de mecanismos genéticos como hipermutación somática y rearrreglos cromosómicos, los cuales se sabe que pueden fallar en el LDCG-B (Pasqualucci L et al, 2001) y por lo tanto hacer a una célula neoplásica.

En un principio se planteó analizar la expresión genética en células provenientes de los ganglios linfáticos (tejido fresco) de los pacientes, sin embargo una limitante para esto fue que los pacientes remitidos al Hospital de Oncología del CMN Siglo XXI IMSS, se presentan con diagnóstico previo realizado en ganglios linfáticos, por lo que la toma de una segunda biopsia resulta problemática. En un futuro se tendría la posibilidad de trabajar con los bloques de tejido que proporcionan los pacientes al servicio de Patología del Hospital, por lo que resultaría muy interesante analizar la expresión (genética y de proteínas) de los mismos genes que se analizaron en médula ósea para comparar y correlacionar lo que está ocurriendo en ambos lugares anatómicos en los pacientes con LDCG-B tanto al momento del diagnóstico como antes y después del tratamiento anti-neoplásico.

Resultó interesante encontrar alteraciones en progenitores hematopoyéticos que no solamente son capaces de generar células mieloides ya que ambas poblaciones analizadas (CD34+LIN- y CD34+CD38-LIN-) aún mantienen el potencial para generar diferentes linajes hematopoyéticos tanto mieloides como linfoides. De lo anterior, se desprende que el estudio de diferentes subpoblaciones celulares de médula ósea, desde progenitores muy primitivos que aun no están comprometidas con algún linaje en particular, hasta subpoblaciones que ya se encuentran comprometidas hacia la línea linfóide, pudiera definirnos, si este fuera el caso, a qué nivel dentro de la jerarquía hematopoyética, se están originando las alteraciones que dan origen al LDCG-B. Dado que los Linfomas Difusos son en su mayoría de linaje B el análisis de la subpoblación hematopoyética de progenitores linfoides de linaje B, CD34+CD19+ daría evidencia de si existen alteraciones funcionales y moleculares a nivel de esta población.

En este momento la identidad de la célula a partir de la cual se origina el linfoma es materia de controversia por lo que no podemos descartar si los fenómenos observados en las poblaciones hematopoyéticas analizadas son las alteraciones primarias que dieron origen al linfoma o si son un reflejo de la enfermedad que se está desarrollando en ganglios linfáticos.

XI CONCLUSIONES

En el presente estudio, observamos alteraciones moleculares en las tres poblaciones celulares analizadas, incluyendo a las células maduras reconocibles por su morfología (Población I), así como a los progenitores hematopoyéticos primitivos (Poblaciones II y III). Este trabajo demuestra que la médula ósea de pacientes con LDCG-B no es completamente normal, sino que presenta diferencias sutiles en la expresión genética y de proteínas de moléculas como ICE, BCL-2, C-MYC y P53 en células hematopoyéticas.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de RT-PCR Multiplex demostraron expresión de ice disminuida en muestras de pacientes en comparación con médula ósea normal, en las tres poblaciones analizadas. La expresión de bcl-2 también estuvo disminuida en la Población I, y c-myc en las Poblaciones I y II de pacientes, en comparación con su contraparte normal. Las diferencias en la expresión de p53 entre muestras de pacientes y muestras normales no fueron significativas.

En lo que se refiere al análisis de proteínas, se observó que de manera general las cuatro moléculas incrementaron su expresión en las diferentes poblaciones de células hematopoyéticas de médula ósea de pacientes con LDCG-B en comparación con médula ósea normal. De manera interesante estas proteínas se expresaron predominantemente en las células progenitoras más primitivas.

Es posible que las deficiencias en los potenciales de proliferación y expansión reportadas previamente en estos pacientes (Martínez-Jaramillo, 2004) pudieran ser explicadas por las alteraciones moleculares aquí detectadas. Sin embargo la posible participación de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea en el origen del LDCG-B debe ser analizada en mayor detalle en estudios posteriores.

XII PERSPECTIVAS

- Realizar análisis funcionales de la inducción de apoptosis a través de la vía Fas/CD95 en distintos progenitores hematopoyéticos de médula ósea de pacientes con LDCG-B.
- Un punto muy interesante para analizar a nivel de progenitores hematopoyéticos de médula ósea, sería la búsqueda de los diferentes marcadores moleculares que se determinaron en los dos subtipos de LDCG-B identificados por Alizadeh y cols. en el 2000. Así mismo, la aplicación de las nuevas metodologías de análisis molecular, como la hibridación genómica comparativa y los microarreglos de DNA, en diferentes poblaciones hematopoyéticas de médula ósea en pacientes con LDCG-B, brindarían un panorama más amplio de lo que está ocurriendo con la biología de esta patología.
- Caracterización funcional y molecular de la población hematopoyética CD34+CD19+ de médula ósea de pacientes con LDCG-B.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329: 987-94.
- Abboud NC and Lictman AM. Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. Chapter 4. In Williams Hematology McGraw-Hill Sixth edition 2001 USA.
- Abourl-Nasr R, O'Brien S, Freireich EJ, Ginsberg CF, et al. "T-cell-rich B-cell lymphoproliferative disorder" of the bone marrow. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 1023-31.
- Akashi K and Weissman LI. Stem cells and Hematolymphoid Development. Chapter 2. In Hematopoiesis Zon IL. Oxford University Press, 2001.
- Akasaka T, Veda C, Kurata M, Akasaka H, et al. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL-6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. *Blood* 2000; 96: 2907-09.
- Albalwi M, Hammond DW, Goepel JR, Hough RE, et al Semi-Quantitative Fluorescence In situ Hybridization analysis indicates that the myc protein is consistently stabilized both before and after transformation of low-grade follicular center to high-grade diffuse large cell lymphoma. *Lab Invest* 1999; 707: 707-15.

- Alizadeh A, Eisen M, Davis R.E, Ma C, Sabet H, et al. The Lymphochip: A Specialized cDNA Microarray for the Genomic-scale Analysis of Gene Expression in Normal and Malignant Lymphocytes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Volume LXIV. 1999; 71-8.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis ER, Ma C, Lossos IS, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-11.
- Alvares LC, Matutes E, Scully AM, et. al. Isolated bone marrow involvement in diffuse large B cell lymphoma: A report of three cases with review of morphological, immunophenotypic and cytogenetic findings. *Leuk & Lymph* 2004; 45: 469-75.
- Avilés A, Díaz-Maqueo JC, García EL. Maintenance therapy with interferon alfa 2b in patients with diffuse large cell lymphoma. *Invest New Drugs* 1992; 10: 351-8.
- Avilés A, Nambo MJ, Talavera A. GM-CSF instead of hematological support during high dose chemotherapy for refractory malignant lymphomas. *Leuk Lymphoma* 1995; 17: 327-30.
- Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Okon E, Rabizadeh E. Bcl-2, Bcl-x, Bax, and Bak expression in short- and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2860-66.
- Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 2804.
- Ben-Ezra JM, King BE, Harris AC, Todd WM, Kornstein MJ. Staining for Bcl-2 protein helps to distinguish benign from malignant lymphoid aggregates in bone marrow biopsies. *Mod Pathol* 1994; 7: 560-4.
- Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan IO, Dick, JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature Med* 1998; 9: 1038.
- Boxer ML, Dang VC. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 2001; 20: 5595-5610.

- Bradley JF, Rothberg PG, Ladanyi M, Chaganti RSK. Hypermethylation of the myc gene in diffuse large cell lymphomas with translocations involving band 8q24. *Genes Chrom Cancer* 1993; 7: 128-30.
- Capello D. et al. Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood* 2000; 95: 651-59.
- Cardoso A, Li M-L, Batard P. Release from quiescence of CD34+CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 8707-8711.
- Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1993; 177: 1331.
- Cuneo A and Castoldi GL Diffuse large cell lymphoma. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. May 2000.
- Cotran SR, Kumar V, Robbins LS. Robbins Pathologic basis of disease. W. B. Saunders Company 6th edition. 2001.
- Chan KCJ. The new world health organization classification of lymphomas: the past, the present and the future. *Hematol Oncol* 2001; 19: 129-50.
- Chen G, Gharib TG, Huan CC, Taylor JM, Misek DE, Kardias SL, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 304-313.
- Chenevix-Trench G, Behm FG, Westin EH. Somatic rearrangements of the MYC oncogene in primary human diffuse large-cell lymphoma. *Int J Cancer* 1986; 38: 513-6.
- Estalilla OC, Koo Ch, Brynes RK, Medeiros LJ. Intravascular large B-cell lymphoma. A report of five cases initially diagnosed by bone marrow biopsy. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 248-55.

- Espinoza-Hernandez L, Cruz-Rico J, Benítez-Aranda H, Martínez-Jaramillo G, Rodríguez-Zepeda MC, Vélez-Ruelas MA, Mayani H. In vitro characterization of the hematopoietic system in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2001; 25: 295-303.
- Farrugia MM, Duan L, Reis MD, Ngan BY, Berinstein NL. Alterations of the p53 tumor suppressor gene in diffuse large cell lymphomas with translocations of the c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Blood* 1994; 83: 191-8.
- Flores-Guzmán P, Flores-Figueroa E, Martínez-Jaramillo G, Mayani H. In vitro characterization of two lineage-negative CD34(+) cell-enriched hematopoietic cell populations from human UC blood. *Cytotherapy* 2005; 7(4):33-4.
- Galimberti S, Marasca R, Caracciolo F, et al. The role of molecular monitoring in autotransplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 581-87.
- Gascoyne DR, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90: 244-51.
- Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995; 3: 459-73.
- Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995; 3: 459-73.
- Gniadecki R, Lukowsky A, Rossen K, et al. Bone marrow precursor of extranodal T-cell lymphoma. *Blood* 2003; 102: 3797-99.
- Greiner TC, Medeiros JL, Jaffe ES. Non Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Suppl* 1995; 75: 370-9.
- Gómez CJ. Linfomas B y T. Biología, Clínica y Tratamiento. 2ª edición 2002 Nova Sidonia Oncología. Madrid, España.

- Gordon LI, Harrington D, Andersen J. Comparison of a second-generation combination chemotherapeutic regimen (m-BACOD) with a standard regimen (CHOP) for advanced diffuse non-Hodgkin's lymphoma. *New Eng J Med* 1992; 327: 1342-6.
- Harada S, Suzuki R, Uehira K, et al. Molecular and immunological dissection of diffuse large B cell lymphoma: CD5+, and CD5- with CD10+ groups may constitute clinically relevant subtypes. *Leukemia* 1999; 13: 1441-47.
- Haouin C, Lepage D, Gisselbrecht C. Comparison of autologous bone marrow transplantation with sequential chemotherapy for intermediate and high grade non-Hodgkin's lymphoma in first remission. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2543-51.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, et al. A Revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994; 8: 1361-5.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, et al. A revised European American classification of lymphoid neoplasms proposed by the International study group. A summary version. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 539-40.
- Hermine, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1996; 87: 265-8.
- Hiddemann W, Longo DL, Coiffier B, Fisher RI, et al. Lymphoma classification- The gap between biology and clinical management is closing. *Blood* 1996; 88: 4085-9.
- Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, Liebermann DA. The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 3414-21.
- Hosokawa Y, et al. The Ikaros gene, a central regulator of lymphoid differentiation, fuses the BCL6 gene as a result of t(3;7)(q27;p12) translocation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2000; 95: 2719-21.

- Huerta-Zepeda A, Talavera A, Avilés A, Neri N, Mayani H. In vitro hematopoiesis in patients with malignant lymphoma during active disease and at complete clinical remission after chemotherapy. *Leuk Lymphoma* 2000; 39: 613-24.
- Ichikawa A, Hotta T, Takagi N, Tsushita K, Kinoshita T, Nagai H, Murakami Y, Hayashi K, Saito H. Mutations of p53 gene and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. *Blood* 1992; 79: 2701-7.
- Ishii T, Nishihara M, Ma F, et al. Expresión of stromal cell-derive factor-1/pre-B cell growth stimulating factor receptor, CXC chemokine receptor 4, on CD34+ human bone marrow cells is a phenotypic alteration for committed lymphoid progenitors. *J Immunol* 1999; 163: 3612-20.
- Ito M, Kim Y, Choi JW et. al. Prevalence of intravascular large B-cell lymphoma with bone marrow involvement at inicial presentation. *Int J Hematol* 2003; 77: 159-63.
- Jiménez-Zepeda VH, Jiménez-Zepeda R. Linfoma No Hodgkin: clasificación biológica, diagnóstico y tratamiento. *Gac Méd Méx* 1998; 134: 443-63.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic análisis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-21.
- Katzenberger T, Lohr A, Schwarz S, et. al. Genetic analysis of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphomas suggests an origin from a somatically mutated CD5+ progenitor B cell. *Blood* 2003; 101: 699-702.
- Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, Quief S, Lecocq G, Bastard C. LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphoma. *Nat Genet* 1993; 5: 66-70.
- Kobayashi t, Yamaguchi M, Kim S, Morikawa J, et al. Microarray reveals differences in both tumors and vascular specific gene expression in de novo CD5+ and CD5- diffuse large B- cell lymphomas. *Cancer Res* 2003; 63: 60-6.

- Korsmeyer JS. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res Suppl* 1999; 59:1693-1700.
- Kramer MHH, Hermans J, Wijburg E et al. Clinical relevance of bcl-2, bcl-6 and cmyc rearrangements in diffuse large B-Cell Lymphoma. *Blood* 1998; 92: 3152-62.
- Krause SD, Jo Fackler M, Civin CI, May SW. CD34: Structure, Biology, and Clinical Utility. *Blood* 1996; 87: 1-13.
- Landsorp PM, Sutherland HJ, Eaves CJ. Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow. *J Exp Med* 1990; 172: 363.
- LeBien T. Lymphoiesis. 1997 Chapter 5. Leukemia.
- LeBien T. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 2000; 96: 9-23.
- Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow, II: normal B lymphocyte development. *Blood* 1987; 70:1316-24.
- Liang Y, Van Zant G. Genetic control of stem cell properties and stem cells in aging. *Curr Opin Hematol* 2003; 10: 195-202.
- Lossos IS, Alizadeh AA, Ideen M, Warnke R, Thorstenson Y, Oefner JP, Brown OP, Botstein D, Levy R. Transformation of Follicular Lymphoma to Diffuse Large Cell Lymphoma: Alternative Patterns with Increased or Decreased Expression of c-myc and its regulated genes. *PNAS* 2002; 99: 8886-91.
- Lukes RJ and Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 1974; 34: 1488-1503.
- Macintyre EA, Belanger C, Debert C, et al. Detection of clonal CD34+19+ progenitors in bone marrow of bcl-2-IgH-positive follicular lymphoma patients. *Blood* 1995; 86: 4691-98.
- Macintyre E, Willenford D, Morris WS. Non-Hodgkin's lymphoma: molecular features of B cell lymphoma. *American Society of Hematology* 2000: 180-210.

- Mariani SM, Matiba B, Armandola EA, Krammer PH. Interleukin 1beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. *J Cell Biol* 1997; 137: 221-9.
- Matolcsy A, Casali P, Warnke RA, Knowles DM. Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene. *Blood* 1996; 88: 3937-44.
- Martínez-Jaramillo G, Avilés A, Neri N, et. al. In vitro proliferation and expansion of hematopoietic progenitors from patients with diffuse large B-cell lymphoma before and after chemotherapy. *Leuk Lymph* 2004; 45:
- Mayani H, Baines P, Jones a, Hoy t, Jacobs A. Effects of rhGM-CSF on single CD-34 positive hematopoietic progenitors from human bone marrow. *Int J Cell Cloning* 1989; 7: 30.
- Mayani H, Guilbert L, Janowska-Wiwczonek (1992) Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Hematol* 49: 225.
- Mayani H. Las células seminales del sistema hematopoyético. En: Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: mecanismos celulares y moleculares. Soto CI, Cáceres CJR, Mendoza RFJ, Weiss SB. Plaza y Valdes editores. 1999.
- Monni O, Heikki J, Franssila K, Knuttila S. DNA copy number changes in diffuse large B- cell lymphoma- comparative genomic hybridization study. *Blood* 1996; 12: 5269-78.
- Monni O, Heikki J, Franssila K, Klefstrom J, et al. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large cell lymphoma. *Blood* 1997; 90: 1168-74.
- Monni O, Franssila K, Joensuu H, Knuttila S. BCL2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1999; 34: 45-52.
- Mundle SD, Venugopal P, Cartlidge JD, Pandav DV, et al. Indication of an involvement of interleukin-1 beta converting enzyme like protease in intramedullary apoptotic cell death in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 1996; 88: 2640-7.

- Ngan B-Y, Chen-Levy Z, Weiss LM. Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *New Engl J Med* 1988; 318: 1638-41.
- Nordengren J, Casslen B, Gustavsson B, Einardottir M, Willen R. Discordant expression of mRNA and protein for urokinase and tissue plasminogen activators (u-PA, t-PAO) in endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 17: 195-201.
- Ohshima A, Miura I, Hashimoto K, Takahashi N, et al. Rearrangements of the BCL6 gene and chromosome aberrations affecting 3q27 in 54 patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1997; 27: 329-34.
- Ortega V, Verastegui E, Flores G, Meneses A, Ocadiz R, Alfaro G. Non-Hodgkin's lymphomas in México. A clinicopathological and molecular analysis. *Leuk Lymphoma* 1998; 31: 575-82.
- Papajik T, Jedlickova K, Kriegova E, et al. Polymerase chain reaction detection of cells carrying t(14;18) in bone marrow of patients with follicular and diffuse large B-cell lymphoma: the importance of analysis at diagnosis and significance of long-term follow-up. *Neoplasma* 2001; 48: 501-5.
- Perkin S, Feishman. Hematopoietic microenvironment. *J Clin Invest* 1998; 81: 1072.
- Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nandjangu G, Changanti RSK, Küppers F, Dalla-Favera R. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphoma. *Nature* 2001; 412: 341-46.
- Perscarmona E, Sanctis V, Pistilli A, Pacchiarotti A, et al. Pathogenetic and clinical implications of bcl-6 and bcl-2 gene configuration in nodal diffuse large B-cell lymphomas. *J Pathol* 1997; 183: 281-6.
- Plumas J, Jacob M, Chaperot L, Molens J, Sotto J, Bensa J. Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis. *Blood* 1998; 8: 2875-85.

- Ponzoni M, Li CY. Isolated bone marrow non-Hodgkin's lymphoma: a clinicopathologic study. *Mayo Clin Proc* 1994; 69: 37-43.
- Prendergast GC. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 1999; 18: 2967-87.
- Quesenberry JP and Colvin AG. Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. Chapter 14. In Williams Hematology McGraw-Hill Sixth edition 2001 USA.
- Rosenberg SA et. al. National Cancer Institute sponsored study classification of non Hodgkin's Lymphomas. *Cancer* 1982; 49: 2112-16.
- Rosenwald A, Wright G, Chan CW, Connors MJ, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1937-47.
- Ryan KM, Birnie GD. Myc oncogenes: The enigmatic family. *Biochem J* 1996; 314: 713-21.
- McKeithan TW. Molecular biology of Non-Hodgkin's lymphoma. *Sem Oncol* 1990; 17: 30-42.
- Rywlin AM, Ortega RS, Domínguez CJ. Lymphoid nodules of bone marrow: normal and abnormal. *Blood* 1974; 43: 389-400.
- Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Medicine* 2002; 8: 68-74.
- Staples WG, Getaz EP. Bone marrow involvement in malignant lymphoma without peripheral lymphadenopathy. *S Afr Med J* 1977; 108: 570-578.
- Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, et al. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 2000; 13: 199-212.
- Sionov VR, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999; 18: 6145-57.

- Smalley RV, Anderson JW, Hawkins MJ. Interferon alfa combined with cytotoxic chemotherapy for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *New Engl J Med* 1992; 327: 1336-40.
- Spangrude GJ., Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse haematopoietic stem cells. *Science* 1988; 241: 58.
- Spits H, Blom B, Jaleco AC, et al. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol Rev* 1998; 165:75-86.
- Stansfeld AG, Diebold J, Kapanci Y, Kelenyi G, et al. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1988; 1: 292-3.
- Steidl U, Kronenwett R, Rohr U, Fenk R, et al. Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotype of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells. *Blood* 2002; 99: 2037-44.
- Stein H, Dallenbach F. Diffuse large cell lymphomas of B and T cell type. In Knowles DM (ed): Neoplastic hematopathology. 1992 Baltimore: Williams & Wilkins pp 675-714.
- Szilvassy JS. The Biology of Hematopoietic Stem Cells. *Arch Med Research* 2003; 34: 446-460.
- Stern RC, Liu K, Dodge R, et al. Significance of lymphoglandular bodies in bone marrow aspiration smears. *Diagn Cytopathol* 2001; 24: 240-43.
- Strauchen JA. Primary bone marrow B-cell lymphoma. Report of four cases. *Mount Sinai J Med* 2003; 70: 133-38.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit MV. Apoptosis signaling. *Annual Rev Biochem.* 2000; 69: 217-45.
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, et al. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* 1997; 186: 25-37.

- Tamayo P. Interpreting patterns of gene expression with self organizing maps: Methods and application in hematopoietic differentiation. *Proc Nat Acad Sci USA* 1999; 96: 2907-12.
- Terstappen LWMM, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 1991; 77:1218-1223.
- Totzke G, Brüning T, Vetter H, Schulze-Osthoff K, Ko Y. p53 downregulation in myelodysplastic syndrome – a quantitative analysis by competitive RT-PCR. *Leukemia* 2001; 15:1663-76.
- Volpe G, Vitolo U, Carbone A, Pastore C, et al. Molecular Heterogeneity of B-lineage diffuse large cell Lymphoma. *Genes Chrom Cancer* 1996; 16: 21-30.
- Watt SM, Visser JW: Recent advances in the growth and isolation of primitive haemopoietic progenitor cells. *Cell Prolif* 1992; 25: 263.
- Vitolo et al. Point mutations of the BCL-6 gene: clinical and prognostic correlation in B-diffuse large cell lymphoma. *Leukemia* 2002; 16: 268-75.
- Voso MT, Hohaus S, Moos M, Haas R. Lack of t (14;18) polymerase chain reaction-positive cells in highly purified CD34+ cells and their CD19 subsets in patients with follicular lymphoma. *Blood* 1997; 89: 3763-68.
- Wilson WH, Teruya-Feldstein J, Fest T, Harris C, et al. Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in Non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997; 89: 601-9.
- Wong KF, Chan JK, Ng CS, et al. Large cell lymphoma with initial presentation in the bone marrow. *Hematol Oncol.* 1992; Sep-Oct 10: 261-71.
- Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M, Ichinohasama R, et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood* 2002; 99: 815-21.
- Yao M, Fouillar L, Lemoine FM, et al. Ex vivo expansion of CD34-positive peripheral blood progenitor cells from patients with non-Hodgkin's lymphoma : no evidence of concomitant

expansion of contaminating bcl-2/JH-positive lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 497-503.

-Yokoyama J, Fujimiya Y, Yamaguchi T, Shiga K. et. al. Occult lymphoma cells prevalent in autologous marrow from non-Hodgkin's diffuse lymphoma. *Am J Hematol* 2003; 73: 1-11.

- Yokoyama J, Fujimiya Y, Yamaguchi T, et. al. Occult lymphoma cells prevalent in autologous marrow from non-Hodgkin's diffuse lymphoma. *Am J Hematol* 2003; 73: 1-11.

- Xerri L, Devillard E, Bouabdallah R, Hassoun J, et al. Quantitative analysis detects ubiquitous expression of apoptotic regulators in B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 1999; 13: 1548-53.