

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LA
INTERLEUCINA 6 COMO FACTOR
AUTOCRINO EN LA LEUCEMIA LINFÁTICA
CRÓNICA B

TESIS DOCTORAL

ENRIQUE BERROCAL VALENCIA

MADRID, 1995


INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS


Esta Tesis estudia el papel de la interleucina 6 en la Leucemia Linfática Crónica B. Ha sido realizada por Enrique Berrocal Valencia en el Laboratorio del Servicio de Medicina Interna I de la Clínica Puerta de Hierro (Madrid). Este trabajo reúne las condiciones científicas exigidas para poder optar al grado de Doctor.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Codirector

El Director de la Tesis


17-11-95
Fdo.: _____
(fecha y firma)
D.N.I.: 50282726


17-11-95
D.N.I.: 5374416


16-11-95
Fdo.: _____
(fecha y firma)
D.N.I.: 12006505

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

JUAN J. PICAZO DE LA GARZA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA I DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

INFORMA: Que una vez examinado el Trabajo presentado por D. ENRIQUE BERROCAL VALENCIA, titulado: ESTUDIO Y CARACTERIZACION DE LA INTERLEUCINA 6 COMO FACTOR AUTOCRINO EN LA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA B, este Departamento da su conformidad para que dicho Trabajo sea leído y defendido en público con vista a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

21-12-1995

El Director del Departamento



Fdo.: ~~Juan J. Picazo de la Garza~~
(fecha y firma)
21-12-1995

*A mi familia,
Iglesia doméstica*

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor A. Durántez, Jefe de Servicio de Medicina Interna I de la Clínica Puerta de Hierro, por su apoyo en mi formación como médico especialista y en la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. J. A. Vargas, por su orientación en este proyecto de investigación y por su generosa transmisión de conocimientos. Al Dr. J. C. Gea por su ayuda durante estos años.

Al Dr. J. L. Subiza, por haber aceptado ser tutor de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. F. J. Diego y al Dr. M. Yebra, que han contribuido a mi formación como médico especialista.

Al Servicio de Hematología de la Clínica Puerta de Hierro: al Dr. R. Cabrera, y especialmente a la valiosa ayuda científica y humana de la Dra. M. P. LLamas a todo lo largo del desarrollo del trabajo.

A los Servicios de Inmunología y de Estadística de la Clínica Puerta de Hierro, por su colaboración.

A C. Lorences, G. Peraile, y compañeros de Residencia que han trabajado en el Laboratorio del Servicio de Medicina Interna I durante mi estancia.

A la Fundación L.A.I.R. y al Fondo de Investigaciones Sanitarias (F.I.S.), por la concesión de ayudas económicas para llevar a cabo este estudio.

A las personas que me quieren, por su cariño y oración perseverante; y entre ellas, a mis padres y hermanas, Blanca Esther y Cristina, y a Pilar.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1. LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B	2
1.1. Introducción	2
1.2. Inmunobiología de la LLC-B	4
1.3. Inmunidad celular y humoral en la LLC-B	9
1.3.a. Inmunidad celular	9
1.3.b. Inmunidad humoral	10
1.4. Autoinmunidad en la LLC-B	11
1.5. Alteraciones citogenéticas y protooncogenes en la LLC-B	12
1.5.a. Alteraciones citogenéticas	12
1.5.b. Protooncogenes	13
1.6. Estadiaje	14
1.6.a. Clasificación de Rai	14
1.6.b. Clasificación de Binet	15
1.6.c. Otros sistemas de estadiaje	15
1.7. Factores pronósticos	18
1.8. Tratamiento	19
2. CITOCINAS Y LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B	22
2.1. Introducción	22
2.2. Factor de necrosis tumoral alfa	23
2.3. Interleucina 1	27
2.4. Interleucina 2	29
2.5. Interleucina 3	32
2.6. Interleucina 4	33
2.7. Interleucina 7	35
2.8. Interleucina 8	37
2.9. Interleucina 10	38
2.10. Factor de crecimiento transformador beta	40
2.11. Interferón alfa	42
2.12. Interferón gamma	44
2.13. Otras citocinas	46

2.13.a.	Interleucina 5	46
2.13.b.	Interleucina 6	47
2.13.c.	Interleucina 9	47
2.13.d.	Interleucina 11	48
2.13.e.	Interleucina 12	48
2.13.f.	Interleucina 13	48
2.13.g.	Interleucina 14	49
2.13.h.	Interleucina 15	50
2.13.i.	Interleucina 16	50
2.13.j.	Factor inhibidor de leucemias. Factor neurotrófico ciliar. Oncostatina M. Cardiotropina 1	50
2.13.k.	Factor estimulador de colonias granulocíticas y macrofágicas. Factor estimulador de colonias granulocíticas. Factor estimulador de colonias macrofágicas	52
2.13.l.	Factor de células "stem"	53
2.13.m.	Eritropoyetina	54
2.13.n.	Trombopoyetina	54
2.13.ñ.	Factor de necrosis tumoral beta o linfoxina	54
2.13.o.	Interferón beta	55
2.13.p.	Factor de crecimiento básico de los fibroblastos	55
2.13.q.	Otras citocinas	56
3.	LA INTERLEUCINA 6	58
3.1.	Introducción	58
3.2.	La proteína y el gen de la interleucina 6	58
3.3.	Origen celular y regulación de la producción de la interleucina 6	59
3.4.	Regulación del receptor de la interleucina 6	59
3.5.	Actividades biológicas de la interleucina 6	61
3.6.	Alteración en la regulación de la expresión de la interleucina 6 y su relación con procesos patológicos	63
3.7.	La interleucina 6 en la leucemia linfática crónica B	66
3.7.a.	Expresión constitutiva del gen de la IL-6	66
3.7.b.	Acción de la IL-6 sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B	67
3.7.c.	Expresión de los receptores de la IL-6 en la membrana de los linfocitos de la LLC-B y detección del receptor soluble de la IL-6	67
3.7.d.	Presencia de la IL-6 en el suero de los pacientes y producción de la citocina por las células de la LLC-B en cultivo	68
3.7.e.	Acción de la IL-6 sobre la apoptosis en la LLC-B	69
3.8.	Conclusión	69
4.	CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE CITOMETRÍA DE FLUJO	70
4.1.	Introducción a la citometría de flujo	70

4.2.	Parámetros: "side scatter" y "forward scatter"	71
4.3.	Conceptos básicos de la electrónica en la citometría de flujo	72
4.4.	El análisis	73
4.5.	La fluorescencia	74
4.6.	Aplicaciones de la citometría de flujo	75
4.6.a.	Análisis fenotípico de las subpoblaciones celulares	75
4.6.b.	Separación celular ("sorter")	81
4.6.c.	El ciclo celular	81
 PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO		 83
 PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS		 87
1.	MATERIAL	88
1.1.	Aparatos	88
1.2.	Productos	88
2.	PACIENTES Y MUESTRAS DE SANGRE	90
2.1.	Pacientes	90
2.2.	Muestras recogidas	91
3.	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE TOTAL: OBTENCIÓN DE LA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS B LEUCÉMICAS	93
3.1.	Obtención de las células mononucleadas de sangre periférica (CMSP)	93
3.2.	Exclusión de linfocitos T de las CMSP obtenidas, por roseteo con hematíes de carnero tratados con AET	94
3.2.a.	Preparación del AET	94
3.2.b.	Exclusión de los linfocitos T de las CMSP	94
3.3.	Exclusión de las células adherentes (monocitos)	95
4.	PARÁMETROS ANALIZADOS	96
4.1.	Caracterización fenotípica de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo	96
4.1.a.	Anticuerpos monoclonales utilizados	97
4.1.b.	Procesamiento de las muestras para su análisis	99
4.1.b.1.	Inmunofluorescencia directa	99
4.1.b.2.	Inmunofluorescencia indirecta	100
4.1.c.	Estudio de la viabilidad celular y controles	101
4.1.d.	Análisis en el citómetro de flujo	101
4.1.e.	Detección del receptor para hematíes de ratón	103

4.2.	Respuesta proliferativa de las células B leucémicas, estudiada en los cultivos celulares	103
4.2.a.	Cultivo	104
4.2.b.	Medida de la respuesta proliferativa estimulada	104
4.2.c.	Medida de la respuesta proliferativa espontánea	105
4.2.d.	Cuantificación de la proliferación celular	105
4.3.	Obtención de sobrenadantes de los cultivos de las células B leucémicas y análisis de la IL-6 y del receptor soluble de la IL-6 contenidos en los sobrenadantes	105
4.3.a.	Obtención de los sobrenadantes	105
4.3.b.	Análisis de la IL-6 y del receptor soluble de la IL-6	106
4.4.	Determinación de la concentración de la IL-6 y del receptor soluble de la IL-6 en el suero de los pacientes	109
4.5.	Estudio de la diferenciación del linfocito B leucémico bajo el estímulo de la IL-6	109
4.5.a.	Producción de inmunoglobulinas <i>in vitro</i> bajo el estímulo de la IL-6	109
4.5.b.	Estudio fenotípico de los linfocitos B en contacto con la IL-6 en el medio de cultivo	111
4.6.	Análisis del receptor de la IL-6 en la membrana de las células B en cultivo y de los antígenos de activación CD25 y CD71	112
4.6.a.	Cultivo	112
4.6.b.	Adición de mitógenos al cultivo de las células B	113
4.6.c.	Estudio del receptor de la IL-6 en la membrana de los linfocitos B de la LLC-B en cultivo y de los antígenos CD25 y CD71	113
4.7.	Estudio del ciclo celular de los linfocitos B de la LLC-B en cultivo	114
4.7.a.	Cultivo	115
4.7.b.	Adición de mitógenos al cultivo de las células B	115
4.7.c.	Obtención y preparación de las muestras para el análisis del ciclo celular	115
4.7.d.	Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo (Programa "Cell fit")	116
5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	117

RESULTADOS 119

1.	ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGRE PERIFÉRICA	120
1.1.	Población de linfocitos T	120
1.2.	Población de células "natural killer"	122
1.3.	Población de monocitos	122
1.4.	Población de linfocitos B	125
2.	ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO DE LA POBLACIÓN DE LINFOCITOS B PURIFICADA	127

2.1.	Población de linfocitos T, monocitos y células NK	127
2.2.	Población de linfocitos B	128
2.3.	Expresión del antígeno de activación CD25	133
2.4.	Expresión del antígeno de proliferación CD71	135
2.5.	Expresión del receptor de la IL-6 en la membrana de los linfocitos B leucémicos	138
2.5.a.	Técnica de inmunofluorescencia directa	138
2.5.b.	Técnica de inmunofluorescencia indirecta	143
3.	RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS AL PDB, A LA PHA Y AL SAC ₂ + PDB	148
3.1.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a tres días	148
3.1.a.	Empleo del PDB de forma aislada	148
3.1.b.	Empleo de la PHA de forma aislada	148
3.1.c.	Empleo del SAC ₂ en asociación al PDB	151
3.2.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días	151
3.2.a.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días con 100.000 células por pocillo	151
3.2.a.1.	Empleo del PDB de forma aislada	151
3.2.a.2.	Empleo de la PHA de forma aislada	151
3.2.b.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días con 500.000 células por pocillo	153
3.2.b.1.	Empleo del PDB de forma aislada	153
3.2.b.2.	Empleo de la PHA de forma aislada	153
4.	RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS A LA IL-2 EXÓGENA	153
4.1.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a tres días	156
4.1.a.	Empleo de la IL-2 de forma aislada	156
4.1.b.	Empleo de la IL-2 en asociación al PDB	156
4.1.c.	Influencia de la expresión del antígeno CD25 por las células leucémicas en la respuesta proliferativa a la IL-2, empleada sola o en combinación con el PDB	158
4.2.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días	158
4.2.a.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días con 100.000 células por pocillo	158
4.2.a.1.	Empleo de la IL-2 de forma aislada	160
4.2.a.2.	Empleo de la IL-2 en asociación al PDB	160
4.2.b.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días con 500.000 células por pocillo	160
4.2.b.1.	Empleo de la IL-2 de forma aislada	161
4.2.b.2.	Empleo de la IL-2 en asociación al PDB	161
4.2.b.3.	Influencia de la expresión del antígeno CD25 en la proliferación celular leucémica a la IL-2, empleada sola o en combinación con el PDB	161

5.	RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS A LA IL-6 EXÓGENA	162
5.1.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a tres días	162
5.1.a.	Empleo de la interleucina 6 de forma aislada	162
5.1.b.	Empleo de la IL-6 en asociación con el PDB	163
5.1.c.	Empleo de la IL-6 en asociación con SAC ₂	166
5.1.d.	Empleo de la IL-6 en asociación con PDB y SAC ₂	169
5.2.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días	172
5.2.a.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días con 100.000 células por pocillo	172
5.2.a.1.	Empleo de la IL-6 de forma aislada	172
5.2.a.2.	Empleo de la IL-6 en asociación con el PDB	173
5.2.b.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días con 500.000 células por pocillo	175
5.2.b.1.	Empleo de la IL-6 de forma aislada	175
5.2.b.2.	Empleo de la IL-6 en asociación con el PDB	176
6.	RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS A UN ANTICUERPO ESPECÍFICO FRENTE A LA IL-6 EXÓGENA	179
6.1.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a tres días	179
6.1.a.	Empleo de un anticuerpo específico frente a la IL-6	180
6.1.b.	Empleo de un anticuerpo específico frente a la IL-6 asociado al éster del forbol	180
6.2.	Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días	181
6.2.a.	Empleo de un anticuerpo específico frente a la IL-6 de forma aislada	187
6.2.b.	Empleo de un anticuerpo específico frente a la IL-6 asociado al éster del forbol	190
7.	CUANTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA IL-6 Y DE SU RECEPTOR SOLUBLE EN SUERO	193
7.1.	IL-6 en suero	193
7.2.	Receptor soluble de la IL-6 en suero	193
8.	CUANTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA IL-6 Y DE SU RECEPTOR SOLUBLE EN LOS SOBRENADANTES DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS EN CULTIVO	196
8.1.	Detección de la IL-6 en los sobrenadantes	196
8.2.	Detección del receptor soluble de la IL-6 en los sobrenadantes	197
9.	ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS B LEUCÉMICAS CON IL-6, IL-2 Y PDB	197
9.1.	Cuantificación de inmunoglobulinas	198
9.2.	Estudio fenotípico	200
10.	EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE LA IL-6 EN LA MEMBRANA DE SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS EN CULTIVO	204
10.1.	Cultivo en situación basal	204
10.2.	Cultivo con SAC ₂	208
10.3.	Cultivo con IL-6, IL-2 o PDB	209

11. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN (CD25) Y PROLIFERACIÓN (CD71) EN LA MEMBRANA DE SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS EN CULTIVO	214
11.1. Cultivo en situación basal	215
11.1.a. Expresión del CD25	215
11.1.b. Expresión del CD71	216
11.2. Cultivo con SAC ₂	217
11.2.a. Expresión del CD25	217
11.2.b. Expresión del CD71	221
12. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR	222
12.1. Viabilidad de la muestra en el día cero	222
12.2. Viabilidad de las células en cultivo	222
12.2.a. Viabilidad de las células en situación basal	223
12.2.b. Viabilidad de las células en contacto con SAC ₂	223
13. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR	228
13.1. Análisis del ciclo celular en el día cero	228
13.2. Análisis del ciclo celular en el día tres	228
13.3. Análisis del ciclo celular en el día siete	229
DISCUSIÓN	232
CONCLUSIONES	259
BIBLIOGRAFÍA	262

LISTA DE TABLAS

TABLA 1	Expresión de antígenos de superficie celular en procesos linfoproliferativos de célula B	7
TABLA 2a	Sistema de estadiaje de Rai para la LLC (1975)	16
TABLA 2b	Sistema de estadiaje de Rai para la LLC (1987)	16
TABLA 3	Sistema de estadiaje de Binet para la LLC (1981)	17
TABLA 4	Características de los 39 pacientes con leucemia linfática crónica B	92
TABLA 5	Lista de antígenos CD empleados. Intervalo de normalidad para las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica	98
TABLA 6	Fenotipo de las células mononucleadas de sangre periférica en cada paciente	121
TABLA 7	Fenotipo de las células B leucémicas tras su purificación en cada paciente	123
TABLA 8	Fenotipo de las CMSP y de la población B purificada	124
TABLA 9	Fenotipo de las células B leucémicas: Análisis por triple marcaje. Porcentaje de expresión	126
TABLA 10	Intensidad de fluorescencia de los antígenos estudiados en la población B leucémica	134
TABLA 11	Análisis por citometría de flujo del R-IL6 mediante técnica de inmunofluorescencia directa en los linfocitos B de la LLC: porcentaje de expresión (con y sin substracción) e intensidad de fluorescencia (I.F)	146
TABLA 12	Análisis por citometría de flujo del R-IL6 mediante técnica de inmunofluorescencia indirecta en los linfocitos B de la LLC: porcentaje de expresión (con y sin substracción) e intensidad de fluorescencia (I.F)	147
TABLA 13	Índices de proliferación de las células B en cultivo con PDB, PHA y SAC ₂ + PDB	149
TABLA 14	Índices de proliferación de las células B en cultivo con IL-2 e IL-2 + PDB	157
TABLA 15	Índices de proliferación de las células B en cultivo con IL-2 e IL-2 + PDB: 3 días de cultivo/100.000 células por pocillo	159
TABLA 16	Índices de proliferación de las células B en cultivo con IL-2 e IL-2 + PDB: 7 días de cultivo/500.000 células por pocillo	159
TABLA 17	Índices de proliferación de las células B en cultivo con IL-6	164
TABLA 18	Índices de proliferación de las células B en cultivo con IL-6 + PDB	165
TABLA 19	Índices de proliferación de las células B en cultivo con IL-6, SAC ₂ y PDB. Tres días de cultivo/100.000 células por pocillo	168
TABLA 20	Índices de proliferación de las células B en cultivo con Anti-IL6 y Anti-IL6 + PDB	182
TABLA 21	Cuantificación de la IL-6 en suero y en los sobrenadantes de las células B en cultivo	194

TABLA 22	Cuantificación del receptor soluble de la IL-6 en suero y en los sobrenadantes de las células B en cultivo	195
TABLA 23	Producción de inmunoglobulinas por las células B leucémicas: basal, con PDB, PHA e IL-2	201
TABLA 24	Producción de inmunoglobulinas por las células B leucémicas: con IL-6	202
TABLA 25	Producción de inmunoglobulinas por las células B leucémicas: con IL-6 + PDB	203
TABLA 26a	Expresión del R-IL6 en los linfocitos B leucémicos en situación basal. Programa "Lysys II"	206
TABLA 26b	Expresión del R-IL6 en los linfocitos B leucémicos en situación basal. Programa "Paint a gate"	207
TABLA 27a	Expresión del R-IL6 en los linfocitos B de la LLC en cultivo con SAC ₂ . Programa "Lysys II"	210
TABLA 27b	Expresión del R-IL6 en los linfocitos B de la LLC en cultivo con SAC ₂ . Programa "Paint a gate"	211
TABLA 28	Control isotipo para el análisis del R-IL6 por citometría de flujo	212
TABLA 29	Expresión del R-IL6 en los linfocitos B de la LLC en contacto con diferentes mitógenos	212
TABLA 30	Expresión del CD25 en las células B leucémicas en cultivo en situación basal	218
TABLA 31	Intensidad de fluorescencia del antígeno CD71 en células B leucémicas en cultivo	219
TABLA 32	Expresión del CD25 en las células B leucémicas en cultivo con SAC ₂	220
TABLA 33	Porcentaje de células B en cultivo no viables en situación basal	224
TABLA 34	Porcentaje de células B no viables en cultivo con SAC ₂	225
TABLA 35	Análisis del ciclo celular de las células B leucémicas en el día tres de cultivo	230
TABLA 36	Análisis del ciclo celular de las células B leucémicas en el día siete de cultivo	231

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Acciones de la interleucina 6	65
FIGURA 2	Análisis por "Lysys II" de la población leucémica purificada. Expresión del CD5 (FITC), CD19 (PE), HLA-DR (TC)	130
FIGURA 3	Análisis por "Paint a gate" de la población leucémica purificada. Expresión del CD5 (FITC), CD19 (PE), HLA-DR (TC)	132
FIGURA 4	Análisis por "Paint a gate" de la población leucémica purificada. Expresión de la cadena λ de las inmunoglobulinas (FITC), κ (PE), CD19 (TC)	132
FIGURA 5	Análisis por "Paint a gate" de la población leucémica purificada. Expresión del CD19 (FITC), CD20 (PE), CD5 (TC)	137
FIGURA 6	Análisis por "Paint a gate" de la población leucémica purificada. Expresión del CD71 (FITC), CD25 (PE), CD19 (TC)	137
FIGURA 7	Análisis por "Lysys II" de la expresión del receptor de la IL-6 en la población leucémica purificada, mediante una técnica directa de inmunofluorescencia y utilizando como ligando la IL-6 conjugada con PE. Empleo del cálculo matemático de la sustracción de histogramas. Expresión del CD19 (FITC), R-IL6 (PE), CD5 (TC).	140
FIGURA 8	Análisis por "Paint a gate" de la expresión del receptor de la IL-6 en la población leucémica purificada, mediante una técnica directa de inmunofluorescencia y utilizando como ligando la IL-6 conjugada con PE. Expresión del CD19 (FITC), R-IL6 (PE), CD5 (TC)	142
FIGURA 9	Análisis por "Lysys II" de la expresión del receptor de la IL-6 en la población leucémica purificada, mediante una técnica indirecta de inmunofluorescencia. Expresión del CD19 (FITC), R-IL6 (PE).	145
FIGURA 10	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a los diferentes mitógenos utilizados: IL-2 (10 y 100 U/ml) -aislada o en asociación al PDB-, IL-6 (20 y 1.25 ng/ml) -aislada o en asociación al PDB-, Anti-IL6 (25 y 1.5 mcg/ml) -aislado o en asociación al PDB-, PDB, PHA, SAC + PDB. Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo	150
FIGURA 11	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a los diferentes mitógenos utilizados: IL-2 (10 y 100 U/ml) -aislada o en asociación al PDB-, IL-6 (20 y 1.25 ng/ml) -aislada o en asociación al PDB-, PDB, PHA. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo	152
FIGURA 12	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a los diferentes mitógenos utilizados: IL-2 (10 y 100 U/ml) -aislada o en asociación al PDB-, IL-6 (20 y 1.25 ng/ml) -aislada o en asociación al PDB-, Anti-IL6 (25 y 1.5 mcg/ml) -aislado o en asociación al PDB-, PDB, PHA. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 500.000 células por pocillo	154
FIGURA 13	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a los diferentes mitógenos utilizados: IL-2 (10 y 100 U/ml) -aislada o en asociación al PDB-, IL-6 (20 y 1.25 ng/ml) -aislada o en asociación al PDB-, Anti-IL6 (25 y 1.5 mcg/ml) -aislado o en asociación al PDB-, PDB, PHA, SAC + PDB. Experimentos realizados con una duración de tres y siete días, con una concentración celular de 100.000 y 500.000 células por pocillo	155

FIGURA 14	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 y a la combinación de la IL-6 y el PDB. Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo	167
FIGURA 15	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 y a la combinación de la IL-6 y el SAC ₂ . Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo	170
FIGURA 16	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 + SAC ₂ y a la combinación de la IL-6, el SAC ₂ y el PDB. Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo	171
FIGURA 17	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 + PDB y a la combinación de la IL-6, el PDB y el SAC ₂ . Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo	174
FIGURA 18	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 y a la combinación de la IL-6 y el PDB. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo	177
FIGURA 19	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 y a la combinación de la IL-6 y el PDB. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 500.000 células por pocillo	178
FIGURA 20	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B con un anticuerpo específico frente a la IL-6 (Anti-IL6) y la combinación del Anti-IL6 y el PDB. Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo	183
FIGURA 21	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B con un anticuerpo específico frente a la IL-6 (Anti-IL6) y la combinación del Anti-IL6 y el PDB. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 500.000 células por pocillo	184
FIGURA 22	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 y al anticuerpo específico frente a la IL-6 (Anti-IL6). Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo	185
FIGURA 23	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 + PDB y al anticuerpo específico frente a la IL-6 (Anti-IL6) + PDB. Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo	186
FIGURA 24	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 y al anticuerpo específico frente a la IL-6 (Anti-IL6). Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 500.000 células por pocillo	188
FIGURA 25	Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 + PDB y al anticuerpo específico frente a la IL-6 (Anti-IL6) + PDB. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 500.000 células por pocillo	189
FIGURA 26	Determinación de la respuesta proliferativa de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6, en siete muestras. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración de 500.000 células por pocillo	191

FIGURA 27	Determinación de la respuesta proliferativa de los linfocitos B de la LLC-B a un anticuerpo específico frente a la IL-6 (Anti-IL6), en siete muestras. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración de 500.000 células por pocillo	192
FIGURA 28	Análisis por "Paint a gate" de la población leucémica purificada en cultivo. Control isotipo en las células viables y en las que han sufrido apoptosis	227
FIGURA 29	Análisis por "Paint a gate" de la población leucémica purificada en cultivo. Expresión del CD19 (FITC), CD5 (PE), HLA-DR (TC) en las células viables y en las que han sufrido apoptosis	227
FIGURA 30	La IL-6 como factor autocrino negativo en la LLC-B	258

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropina
anti-(TGF β , etc)	Anticuerpo neutralizante frente al TGF β , etc
anti-IL-6	Anticuerpo neutralizante frente a la IL-6
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AET	"2-amino-ethylisothiuroniumbromide"
BE	Bromuro de etidio
bFGF	Factor de crecimiento básico de los fibroblastos
CD	"Cluster differentiation"
c.f.	Citometría de flujo
CFU-E	Unidades formadoras de colonias eritroides
CMSP	Células mononucleadas de sangre periférica
cpm	Cuentas por minuto
CR (1, 2)	Receptor para la fracción del complemento (1, 2)
F(ab)' ₂	Fracción variable de las inmunoglobulinas
Fc	Fracción constante de las inmunoglobulinas
FD	Diacetato de fluoresceína
FITC	Fluoresceína
FSC	"Forward Scatter"
G-CSF	Factor estimulador de colonias granulocíticas
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocíticas y macrofágicas
³ HT	Timidina tritiada
IFN (α , β , γ)	Interferón (alfa, beta, gamma)
Ig (A, G, E, D, M)	Inmunoglobulina (A, G, E, D, M)
IL-1 (α , β)	Interleucina 1 (alfa, beta)
IL-(2 a 16)	Interleucina (2 a 16)
IP	Ioduro de propidio
IWCLL	Grupo Internacional de Estudio de la LLC
κ	Cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas
λ	Cadena ligera lambda de las inmunoglobulinas
LAK	Actividad "Lymphokine activated killer"
LCP	Leucemia de células peludas
LLC-(B, T)	Leucemia linfática crónica (B, T)
LPL-(B, T)	Leucemia prolinfocítica (B, T)
M-CSF	Factor estimulador de colonias macrofágicas
MCP-1	Proteína quimotáctica de los monocitos 1
MDR	Expresión del gen de resistencia a fármacos

MIP-2 (α , β)	Proteína inflamatoria de los macrófagos 2 (α , β)
NK	Células o actividad "natural killer"
n.s.	Estadísticamente no significativo
OPD	Clorhidrato de o-fenilendiamina
PBS	Disolución salina fosfatada
PDB	"Phorbol 12, 13-Dibutyrate"
PE	Ficoeritrina
PHA	Fitohemaglutinina
PWM	"Pokeweed mitogen"
R-IL2 (α y β)	Receptor de la interleucina 2 (cadena alfa y beta)
R-IL6	Receptor de la interleucina 6
R-TNF α	Receptor del Factor de necrosis tumoral alfa
Rs- (IL2 α , IL6)	Receptor soluble (de la cadena alfa de la interleucina 2, de la IL-6)
SAC (1, 2)	Cepa Cowan del <i>Staphylococcus aureus</i> (1, 2)
SBF	Suero bovino fetal
SSF	Suero salino fisiológico
SSC	"Side Scatter"
TC	Tercer color
TGF β	Factor de crecimiento transformador beta
TNF (α , β)	Factor de necrosis tumoral (alfa, beta)
TRF	Factor sustitutivo de células T

INTRODUCCIÓN

1. LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

1.1. Introducción

La leucemia linfática crónica (LLC), descrita en la década de los sesenta como una enfermedad en la que se produce un acúmulo de linfocitos, aparentemente maduros e inmunológicamente incompetentes, es la leucemia de mayor incidencia en los países occidentales. Cerca del 99% de las LLC son del tipo celular B (LLC-B) y alrededor del 1% del tipo celular T (LLC-T). La edad de aparición oscila entre los 60 y 80 años y los casos de LLC en personas con menos de cuarenta años son muy raros (Montserrat y col., 1991). Es más frecuente en varones, siendo la relación varón/mujer igual a 1.5. La etiología es desconocida, aunque se postulan factores hereditarios, genéticos e inmunológicos (Montserrat, 1992). El diagnóstico de la LLC-B se basa en estudios de laboratorio que incluyen fundamentalmente un hemograma -con atención a la morfología de los linfocitos-, una biopsia de médula ósea, y un mínimo de marcadores celulares que establezcan que la naturaleza de las células sea B y que muestren un fenotipo característico de la enfermedad.

La LLC-B está incluida en la clasificación de las enfermedades linfoproliferativas crónicas de células B. Estas son entidades hematológicas heterogéneas, desde el punto de vista morfológico, inmunológico y clínico. A este grupo pertenecen la LLC-B, la leucemia prolinfocítica B (LPL-B), la LLC-LPL, el linfoma esplénico con linfocitos vellosos, la leucemia de células peludas (LCP), la LCP variante, el linfoma de células del manto, el linfoma folicular de célula hendida pequeña en fase leucémica, y las proliferaciones de linfocitos B pequeños de tipo no específico. La LLC-B debe ser diferenciada de estas entidades, y también de las neoplasias de la célula T madura, mucho menos frecuentes en nuestro medio que los procesos neoplásicos de células B y que se han clasificado en cuatro tipos principales: la LLC-T, la leucemia prolinfocítica T (LPL-T), el linfoma-leucemia de células T del adulto y el síndrome de Sézary (Gale y Foon, 1987; Litz y Brunning, 1993; Dighiero, 1993; Rosenberg, 1994; Harris y col., 1994).

El Grupo Internacional de Estudio de la LLC (IWCLL, del inglés "International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia") y "The National Cancer Institute-Sponsored Working Group" propusieron en 1989 unas guías similares para el

diagnóstico de la LLC (Montserrat, 1992). Éstas son en esencia las siguientes: a) linfocitosis en sangre periférica superior a $5 \times 10^9/l$, mantenida durante al menos cuatro semanas; b) morfología de linfocitos maduros, con no más del 55% de células linfoideas inmaduras o atípicas; c) fenotipo compatible con LLC: expresión de cadenas kappa (κ) o lambda (λ), presencia débil de inmunoglobulina de superficie y positividad para el antígeno CD5; d) afectación de la médula ósea con infiltración de más del 30% de linfocitos.

Las manifestaciones clínicas y el curso de la enfermedad varía de unos pacientes a otros (Dighiero y col., 1991; Montserrat, 1992). Alrededor de un 20% están asintomáticos al diagnóstico, detectándose la LLC por el hallazgo de linfocitosis absoluta en un hemograma de rutina, o por la presencia de adenopatías no dolorosas. Las adenopatías se desarrollan en más del 90% de los pacientes y pueden afectar a cualquier región ganglionar. A lo largo de la evolución, el acúmulo de adenomegalias puede dar lugar a compresiones de partes blandas. Asimismo, la LLC-B puede afectar a órganos extrahematopoyéticos. Otro tipo de manifestaciones son las derivadas del fracaso hemopoyético. Pese a la precocidad de la infiltración medular, los síntomas derivados de la misma -la anemia, neutropenia y trombocitopenia- suelen ser tardíos en la evolución del proceso, hasta el punto que se consideran datos de enfermedad evolucionada (Montserrat, 1992). Sin embargo, pueden ser más precoces las citopenias -anemia y/o trombocitopenia- de origen autoinmune. Estas citopenias aparecen entre el 5 y el 20% de los casos en cualquier fase de la evolución, incluso como manifestación inicial, y no implican el pronóstico ominoso de las citopenias por mieloptisis.

Las alteraciones en la inmunidad humoral y celular tienen un claro protagonismo en la mayor incidencia de episodios infecciosos en estos pacientes, y posiblemente en que la incidencia de neoplasias en las personas con LLC sea superior a la de la población general (Montserrat, 1992). Las complicaciones infecciosas son la causa de muerte en gran parte de los pacientes con LLC-B (Catovsky y Foa, 1990_b). En un 5% de los casos aparece un componente monoclonal, generalmente constituido por inmunoglobulina M.

En la evolución de la LLC-B puede ocurrir la transformación de la célula B leucémica (Montserrat, 1992). La forma más habitual es la transformación prolinfocitoide (en la que en sangre periférica coexisten linfocitos maduros con hasta un 55% de prolinfocitos), y el síndrome de Richter (linfoma de células grandes), éste con una incidencia aproximada del 5% (Litz y Brunning, 1993; Harris y col., 1994; O'Brien y col., 1995). A diferencia de lo que ocurre en la leucemia mieloide crónica, es excepcional que la LLC evolucione a leucemia aguda (Dighiero y col., 1991; Montserrat, 1992).

1.2. Inmunobiología de la LLC-B

La mayoría de las células de la LLC-B expresan un número de antígenos de superficie celular restringidos a la línea B (Burrows y col., 1993), así como genes de inmunoglobulinas reordenados clonalmente (Freedman, 1990). Los linfocitos B de la LLC-B presentan los siguientes antígenos de membrana:

Inmunoglobulinas de superficie

La mayoría expresan IgM (μ) y, con frecuencia, IgM e IgD ($\mu+\delta$) (Dighiero, 1992). La intensidad de expresión de la inmunoglobulina de superficie es mucho más débil que en el linfocito B normal (Brouet y Seligmann, 1977; Batata y Shen, 1992). Asimismo se objetiva, en la superficie celular, la presencia de la cadena ligera κ o λ , pero no de ambas, lo que apoya la clonalidad del proceso. Esta clonalidad puede demostrarse mediante los estudios con la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (Solanki y col., 1982), y actualmente, mediante el análisis del ADN, que muestra el reordenamiento de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas. Los linfocitos, en una minoría -alrededor del 5%- de los casos de LLC-B, muestran igualmente reordenamiento del gen de la cadena beta del receptor de la célula T pero, al contrario de lo que sucede en células T normales y malignas, el gen de la cadena gamma del receptor celular T no está reordenado.

Receptores para hematíes de ratón

Constituyen un marcador de células B inmaduras. Esto ha sido considerado por muchos autores como el mejor marcador diagnóstico de la LLC-B (Hokland y col., 1992), de hecho, los linfocitos B de sangre normal no forman rosetas con estos hematíes (Batata y Shen, 1992).

Receptores para el C'3d y para la fracción Fc de la IgG

La mayoría de los linfocitos B normales forman rosetas con hematíes rodeados con los componentes del sistema complemento C'3b (CR1) y C'3d (CR2); sin embargo, las células de la LLC-B sólo lo hacen con el CR2. Los linfocitos de la LLC-B presentan receptores para la fracción constante de la inmunoglobulina G (Fc de la IgG) (Dighiero, 1992; Montserrat, 1992).

Antígenos celulares "Pan B"

Las células de la LLC-B expresan los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, DR o DO, pero son heterogéneas en cuanto a la manifestación del antígeno DQ. Expresan también los antígenos CD19, CD20, CD21, CD24 y CD40. La presencia de estos antígenos, si bien es característica de la estirpe celular B, no diferencia a la LLC-B de otras neoplasias de estirpe B (Gale y Foon, 1987; Cheson, 1991; Dighiero, 1992; Montserrat, 1992; Litz y Brunning, 1993; Kipps, 1995; Rozman y Montserrat, 1995) (Tabla 1).

CD5

La expresión del antígeno CD5 es un dato característico, único por su consistencia en el diagnóstico de la LLC-B. Más del 90% de los casos de las LLC-B son CD5 positivos (+) y no está claro que los casos CD5 negativos (-) deban ser incluidos bajo el epígrafe de LLC-B (Juliusson y Gahrton, 1993). Este antígeno no lo expresan los linfocitos de la leucemia de células peludas o tricoleucemia, pero sí los prolinfocitos de las LLC-B y los de las leucemias prolinfocíticas B (LPL-B). Se asocia a la célula T, presentándose tanto en linfocitos T maduros como inmaduros e identifica también a una subpoblación de células B normales. Además de encontrarse en un pequeño porcentaje en la periferia de los centros germinales de los ganglios linfáticos en el adulto (Caligaris-Cappio y col., 1985; Freedman y col., 1987), los linfocitos B CD5 (+) están igualmente presentes en número elevado en la sangre de pacientes con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, y tras un trasplante alogénico de médula ósea. A las células B CD5 (+) se les ha implicado en la formación de autoanticuerpos (Hardy y col., 1994).

Antígenos de activación CD25, CD23, CD71

Más del 50% de los pacientes con LLC-B expresan la subunidad α del receptor de la IL-2 (R-IL2) (CD25) (Kay y col., 1988; Aguilar-Santelises y col., 1993; Tsilivakos y col., 1994; Nakase y col., 1994) y β (Burton y Kay, 1994), aunque la intensidad de su expresión es débil. El antígeno soluble CD25 se detecta en el suero de la mayoría de los casos en los que las células expresan el CD25 (Burton y Kay, 1994).

Las células de la LLC-B expresan también el antígeno de activación CD23, que constituye el receptor de baja afinidad para la IgE (Catovsky y Foa, 1990_b; Banchereau y Rousset, 1992; Dighiero, 1992; Fournier y col., 1992; Montserrat, 1992; Sarfati, 1993). Se ha intentado atribuir un valor pronóstico a la expresión de este antígeno en los linfocitos de la LLC-B, con resultados contradictorios (O'Brien y col., 1995). Por otra parte, el receptor soluble del CD23 está elevado en el suero de pacientes con LLC-B y su nivel se relaciona con la masa tumoral y estadio de la enfermedad (Beguin y col., 1993).

No se observa expresión del antígeno de proliferación CD71 (Dighiero, 1993). Sin embargo, el receptor soluble del CD71 se encuentra elevado en el suero de los enfermos con LLC-B (Beguin y col., 1993).

FMC7 y CD22

Son otros anticuerpos monoclonales de utilidad en la caracterización de la LLC-B, negativos en la mayoría de los casos o expresados en una minoría de las células, mientras que son siempre positivos en la leucemia prolinfocítica B, en la leucemia de células peludas, y en más de la mitad de los casos de linfoma folicular. No se observa expresión del antígeno CD10, ni de otros antígenos asociados a la línea celular T (Gale y Foon, 1987; Catovsky y Foa, 1990_a; Batata y Shen, 1992; Dighiero, 1992; Kipps, 1995).

TABLA 1. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE SUPERFICIE CELULAR EN PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS DE CÉLULA B

	Igs	Igc	R-hr	CD5	CD19/ CD20	Anti- HLA II	FMC7	CD10	CD25	CD38
LLC	d *	- **	+++	+++	+++	+++	+	-	++	-
LPL	f	+	-	+	+++	+++	+++	+	-	-
LCP	f	+	+	-	+++	+++	+++	-	+++	+
LNH ₁	f	-	+	-	+++	+++	++	++	-	+
LNH ₂	m	-	+	+++	+++	+++	++	+	-	-
IE	f	+	-	-	+++	+++	+++	-	+	+
TCP		+++	-	-	-	-	-	+	-	+++

LLC: leucemia linfática crónica

LPL: leucemia prolinfocítica

LCP: leucemia de células peludas

LNH₁: linfoma no Hodgkin de bajo grado (folicular)

LNH₂: linfoma no Hodgkin de grado intermedio

IE: linfoma esplénico con linfocitos peludos

TCP: tumores de células plasmáticas (mieloma múltiple)

Igs: inmunoglobulina de superficie

Igc: inmunoglobulina citoplasmática

R-hr: receptores para los hematíes de ratón

*: d: expresión débil; f: expresión intensa; m: expresión moderada

** : El signo (-) y (+) indican el porcentaje de casos positivos: (-) < 10%; (+) 10 a 40%; (++) 40 a 80%; (+++) 80 a 100%

Moléculas de adhesión

En las células de la LLC-B, es heterogénea la expresión de una diversidad de moléculas de adhesión; entre ellas están: a) las moléculas de superficie de la superfamilia de las inmunoglobulinas (el CD54/molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y el CD58/antígeno 3 asociado a la función del linfocito (LFA-3)); b) de la familia de las integrinas (β_1 (CD29), β_2 (CD18), β_3 (CD61)); c) de la familia de las selectinas (L-selectina/Leu-8), y d) del CD44 o "lymphocyte homing receptor", que participa en la adhesión de los linfocitos B maduros al estroma celular de la médula ósea (Banchereau y Rousset, 1992; Bevilacqua, 1993; De Rossi y col., 1993).

El CD11c es la cadena α de una glicoproteína de dos cadenas, perteneciente a la familia de las integrinas, miembro a su vez de la familia de los antígenos de adhesión celular. Dentro de la heterogeneidad de la enfermedad, los linfocitos B de la LLC-B muestran variabilidad en cuanto a la expresión del CD11c, siendo positivos entre el 48 a 78% de los mismos. La expresión del antígeno es débil, a juzgar por la presencia de fluorescencia de baja intensidad por citometría de flujo (Palutzke y col., 1992). Se ha intentado asociar la diferente expresión antigénica del CD11c en la LLC-B con variaciones en el curso clínico de la enfermedad. Sobre ello existen resultados contradictorios: mientras en unos casos se ha observado relación entre la positividad del CD11c y una forma más agresiva de la enfermedad (Tassies y col., 1991; De Rossi y col., 1993), en otros estudios se objetiva la asociación del antígeno con un curso clínico menos agresivo de la LLC-B (Newman y col., 1993).

Además de la expresión de la cadena α_X (CD11c), se ha estudiado la de la cadena α_L (CD11a) y α_M (CD11b). Las tres cadenas alfa se asocian con las integrinas leucocitarias β_2 . Se ha querido atribuir un significado pronóstico al fenotipo β_1 (-) β_2 (-) β_3 (-), ya que algunos autores han encontrado pacientes con características clínicas más favorables (De Rossi y col., 1993).

Antígenos de la estirpe mielomonocítica

La expresión de antígenos de la estirpe mielomonocítica -CD13 y CD14- en las células de la LLC-B no es infrecuente (Dighiero, 1992; Montserrat, 1992; O'Brien y col., 1995). Se ha relacionado con la capacidad de producir IL-1 por parte de las células de la LLC-B (Morabito y col., 1987) y con la ausencia de expresión del antígeno CD5 (Ikematsu y col., 1994).

En concreto, gracias a los avances en los métodos inmunológicos ha sido posible la caracterización de las células de la LLC-B y la definición de los rasgos distintivos de esta enfermedad con otros procesos patológicos de la célula B. Así, y en resumen, las células de la LLC-B se caracterizan por la expresión débil de las inmunoglobulinas de superficie, el alto porcentaje de formación de rosetas con hematíes de ratón, la expresión del antígeno CD5, la negatividad para el FMC7 y la expresión de marcadores de células B maduras (Freedman y Nadler, 1987; Catovsky y Foa, 1990_b; Batata y Shen, 1992; Dighiero, 1992; Rozman y Montserrat, 1995).

1.3. Inmunidad celular y humoral en la LLC-B

1.3.a. Inmunidad celular

El interés por el papel que juega el linfocito T en las neoplasias crónicas ha aumentado en los últimos años, a medida que se ha progresado en el conocimiento de la interacción entre el linfocito B y T. Aunque hasta aquí sólo se ha hecho mención al linfocito B como célula alterada en la LLC-B, también existen en esta enfermedad alteraciones de la inmunidad celular.

Se ha descrito un aumento en el número absoluto de los linfocitos T en pacientes con LLC-B sin tratamiento previo, fluctuando sus niveles en el curso de la enfermedad, y una inversión del cociente CD4/CD8 en sangre debido al aumento del número de linfocitos T supresores, sobre todo en estadios avanzados de la enfermedad (Laguna, 1983; Gale y Foon, 1987; Dighiero, 1992). Asimismo, se han visto anomalías en los antígenos de superficie del linfocito T, como son el menor porcentaje de células que son reactivas al anticuerpo anti CD3 (Pan T) y el mayor número de células que expresan simultáneamente el antígeno CD4 y CD8, típico de los timocitos y no de los linfocitos T maduros. En general, se acepta que la LLC-B se asocia con una disminución de la función T cooperadora (Lauria y col., 1974; Kay y Kaplan, 1986; Markey y col., 1986).

De igual forma está disminuida la actividad LAK -del inglés, "lymphokine activated killer"- y "Natural Killer" (NK) en la LLC-B. El número absoluto de células NK -indicada por la presencia de los antígenos CD56 y CD57 asociados a células NK- está aumentado (Foon y col., 1990; Dighiero, 1992). Se observa coexpresión de los antígenos de superficie CD8 y CD57 en las células NK, situación poco frecuente en sangre normal. El número de células que expresan el CD16, que identifica el receptor Fc III en las células NK funcionales está, sin embargo, disminuido. Estos

datos sugieren que existe un aumento de células NK funcionalmente inactivas (Foa y col., 1986). Los datos reflejados sobre la función de células T₄, T₈ y NK son contradictorios y de difícil interpretación (Álvarez-Mon y col., 1986; Álvarez-Mon y col., 1987; Freedman, 1990; Dighiero y col., 1991; Dighiero, 1992).

La patogénesis de estos defectos no es clara, pero puede estar en relación con el hecho ya mencionado de que las células de la LLC-B expresan el receptor de la interleucina 2 (CD25) y liberan grandes cantidades del receptor soluble de la interleucina 2 en suero, niveles que pueden correlacionarse con el estadio de la enfermedad (Burton y Kay, 1994). La interleucina 2, producida por los linfocitos T normales, puede ser absorbida por estos receptores, dando lugar a anomalías inmunológicas (Burton y col., 1989; Burton y Kay, 1994).

1.3.b. Inmunidad humoral

Más del 50% de los pacientes con LLC desarrollan hipogammaglobulinemia y su presencia depende del tiempo de evolución y del estadio de la enfermedad (Dighiero, 1992). Este hecho se relaciona con la mayor incidencia de infecciones por organismos encapsulados y por gram negativos en estos enfermos. La hipogammaglobulinemia no es el único mecanismo responsable de la infección en los pacientes con LLC-B, pues la inmunidad celular también está alterada, como se ha mencionado anteriormente. La patogénesis de la hipogammaglobulinemia no está clara, más aún cuando es poco frecuente en otras neoplasias de células B, incluyendo la leucemia linfoblástica aguda, los linfomas difusos y nodulares, la LCP, etc (Gale y col., 1994).

El nivel de inmunoglobulinas no suele normalizarse, a pesar del tratamiento empleado en la LLC. Con la administración intravenosa de inmunoglobulinas en pacientes con LLC-B e hipogammaglobulinemia se reduce, de forma significativa, el número de infecciones bacterianas leves o moderadas, pero no ocurre lo mismo con las infecciones bacterianas de carácter grave, ni con las producidas por virus u hongos; en cualquier caso no se ha visto que su uso aumente la supervivencia de estos pacientes (Cooperative group for the study of immunoglobulin in chronic lymphocytic leukemia, 1988).

1.4. Autoinmunidad en la LLC-B

Es bien conocida que la LLC-B se asocia a manifestaciones autoinmunes. A pesar de ello, la inmunoglobulina de superficie expresada por las células B leucémicas no contribuye de forma directa a los fenómenos autoinmunes que se observan en estos pacientes. Las enfermedades autoinmunes asociadas a la LLC-B surgen con frecuencia de la producción intermitente de autoanticuerpos, en su mayor parte de clase IgG, que reaccionan con antígenos presentes en las células hematopoyéticas humanas -por ejemplo, hematíes o plaquetas-. Estos autoanticuerpos son producidos, aparentemente, por linfocitos B policlonales y no por linfocitos tumorales, como consecuencia de una disregulación inmune asociada con la LLC-B. Hay que destacar que al ser producidos por linfocitos policlonales, estos autoanticuerpos no guardan relación con la clase de inmunoglobulina presente en la membrana de los linfocitos B leucémicos (Kipps y Carson, 1993).

La anemia hemolítica autoinmune aparece en un 15% de pacientes y la trombocitopenia y neutropenia inmune son menos frecuentes (1-2%). La incidencia de anticuerpos antieritrocitarios (con positividad en la prueba de Coombs, pero sin acompañarse de anemia), es mayor que la de la anemia hemolítica autoinmune detectada clínicamente. De forma similar, es frecuente la presencia de autoanticuerpos frente a plaquetas y a otras células hemopoyéticas. La presencia de anemia o trombocitopenia secundaria al ocupamiento medular tiene peor pronóstico que la existencia de anemia o trombocitopenia autoinmune. No se conoce la razón por la que los autoanticuerpos detectados en la LLC, se dirigen casi exclusivamente contra las células hematopoyéticas (Hamblin y col., 1986).

1.5. Alteraciones citogenéticas y protooncogenes en la LLC-B

1.5.a. Alteraciones citogenéticas

El bajo índice mitótico de las células de la LLC-B ha hecho difícil el estudio del cariotipo en esta entidad. No obstante, con el empleo de mitógenos para los linfocitos B, se han podido demostrar alteraciones cromosómicas clonales en más del 50% de los casos.

La anomalía numérica más frecuentemente asociada a la LLC es la trisomía del cromosoma 12 -aislada en un tercio de los casos o asociada con otras alteraciones citogenéticas en los otros dos tercios- (Gale y Foon, 1987; Dighiero, 1992; Juliusson y Gahrton, 1993). La frecuencia de esta anomalía cromosómica aumenta con el empleo de técnicas de hibridación *in situ* no isotópica. Sin embargo, esta alteración cromosómica no es característica de la LLC y se ha descrito también en otras entidades (linfoma no Hodgkin linfocítico de células pequeñas, LPL, LCP, macroglobulinemia de Waldenström).

La anomalía estructural más frecuentemente encontrada en la LLC-B afecta al brazo largo del cromosoma 13, en la banda q14 o en su cercanía, donde se ha localizado el gen 1 del retinoblastoma (RB1). Este gen codifica una proteína nuclear que interviene en el control del ciclo celular en la fase G₁. Deleciones o mutaciones a la altura de este gen supresor podrían intervenir en la patogénesis de algunos casos de LLC-B.

Otra anomalía estructural descrita es la adición de material genético al brazo largo del cromosoma 14 (14q+), donde se han localizado genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (banda q32). La banda q32 está implicada con frecuencia en traslocaciones cromosómicas asociadas a otras neoplasias de células B. En una minoría de pacientes con LLC-B se detecta la traslocación t(11;14)(q13;q32), resultando la yuxtaposición de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas con un hipotético protooncogén llamado Bcl-1, que se identificó posteriormente como el gen PRAD1, que codifica la ciclina D1. La sobreexpresión de este protooncogén puede intervenir en el desarrollo de algunos casos de LLC-B, aunque la neoplasia linfoide a la que se asocia con mayor frecuencia es el linfoma de células del manto.

Excepcionalmente, en la LLC-B se pueden ver otras traslocaciones como la t(14;18), que se asocia con frecuencia a linfomas nodulares de bajo grado de células B, y en la que se yuxtaponen los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas con el oncogén Bcl-2 (ver más adelante). Finalmente, en un 10% de los pacientes con LLC-B se encuentra la traslocación t(14;19)(q32;q13.1), que yuxtapone los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas con el protooncogén Bcl-3. Este protooncogén codifica una proteína implicada en el inicio del ciclo celular, por lo que se sugiere que la sobreexpresión del Bcl-3 intervendría en la patogénesis de algunas LLC-B.

Ninguna de estas alteraciones citogenéticas es específica de la LLC-B y en la mayoría de los casos el cariotipo permanece sin cambios a lo largo de la enfermedad. Dicha situación contrasta con la de la leucemia mieloide crónica y la de los linfomas foliculares, en los que son frecuentes cambios en el cariotipo inicial, lo que se asocia a la progresión de la enfermedad. La existencia de alteraciones

cromosómicas y la complejidad de éstas guarda relación con la probabilidad de la progresión de la LLC-B, e incluso la presencia de anomalías citogenéticas simples conllevan un peor pronóstico; de ahí que, el estudio citogenético deba ser incluido, a ser posible, en la evaluación clínica inicial de las personas con LLC debido a su valor pronóstico (Juliussen y col., 1988; Juliussen y Gahrton, 1990; Dighiero, 1992; O'Brien y col., 1995).

1.5.b. Protooncogenes

No hay ningún oncogén que esté implicado en la génesis de la enfermedad de forma consistente (Gale y col., 1994), al contrario de lo que ocurre en la leucemia mieloide crónica y algunas leucemias agudas.

El Bcl-2 es un protooncogén localizado en el brazo largo del cromosoma 18 (banda q21) con una función importante en la supervivencia celular, y que codifica una proteína -la proteína bcl-2- que tiene como función bloquear la muerte celular programada (Hockenbery y col., 1990; Korsmeyer, 1992). Se ha sugerido que el gen Bcl-2 está sobreexpresado en esta enfermedad, inhibiendo la apoptosis y dando lugar al acúmulo de linfocitos B en la fase G₀ del ciclo celular (Caligaris-Cappio y col., 1992; Hanada y col., 1993; Gale y col., 1994; O'Brien y col., 1995). Se han observado reordenamientos del gen Bcl-2 en un 5 a 10% de pacientes con LLC-B (Rai, 1993), con frecuencia diferentes a los descritos en los linfomas nodulares de células B (Dighiero y col., 1991; Dighiero, 1992). Independientemente de la existencia de reordenamientos del gen Bcl-2, la mayoría de las células de la LLC-B expresan niveles elevados de la proteína bcl-2; esto se ha asociado con una hipometilación en el locus Bcl-2. La sobreexpresión de este protooncogén puede incrementar la resistencia de las células leucémicas a los agentes quimioterápicos empleados en el tratamiento de esta entidad, dificultando la erradicación del clon leucémico.

Ocasionalmente, como se ha mencionado, en la LLC-B se han observado traslocaciones que implican a los protooncogenes Bcl-1 y Bcl-3 (Dighiero, 1992; Newman y col., 1993).

El gen p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (banda p13.1) y codifica una proteína nuclear que actúa como un regulador negativo de la proliferación celular. Se ha observado mutación del gen p53 en el 13% de los pacientes con LLC-B. El papel de estas mutaciones en la biología y progresión de la enfermedad es desconocido, aunque la mutación del gen se observa con más frecuencia en pacientes de LLC-B en estadio avanzado y con peor respuesta al tratamiento quimioterápico (El Rouby y col., 1992; Imamura y col., 1994;

Prokocimer y Rotter, 1994; Kipps, 1995; O'Brien y col., 1995). Además, se han detectado mutaciones en el gen p53 en cerca del 50% de las células neoplásicas de los pacientes con transformación Richter, por lo que se piensa que algunas mutaciones a este nivel tienen lugar a lo largo de la evolución de la LLC-B, lo que confiere a las células leucémicas un comportamiento clínico más agresivo.

Por último, las células de la LLC-B tienen en un 40% una expresión elevada del gen de resistencia a fármacos tipo 1 (MDR1, del inglés "multidrug-resistance 1 gene"). El gen MDR1 está localizado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q21.1) y codifica una glicoproteína P transmembrana que incrementa la resistencia a varios agentes quimioterápicos (colchicina, doxorubicina o vinblastina). Parece ser que una expresión aberrante de este gen en la LLC-B puede jugar algún papel en la patogénesis o evolución clonal en algunos casos.

1.6. Estadiaje

Se han propuesto diferentes sistemas de estadiaje que reflejan una agrupación de variables pronósticas. De forma ideal, estos factores pronósticos deberían usarse para seleccionar una terapéutica óptima. En la LLC-B la acumulación de células tumorales se hace siguiendo un orden: sangre y médula ósea, ganglios, bazo e hígado, etc; lo que ha permitido establecer diferentes estadios evolutivos. Los sistemas de estadiaje más utilizados, que gozan de mayor aceptación internacional son los propuestos por Rai (Rai y col., 1975) y Binet (Binet y col., 1981).

1.6.a. Clasificación de Rai

Esta clasificación incluía en un principio (Rai y col., 1975), cinco estadios basados en la presencia o no de linfadenopatías, esplenomegalia, hepatomegalia y fallo medular, manifestado por anemia (hemoglobina <11g/dl) o trombocitopenia (plaquetas <100.000/mm³). Estos estadios se exponen en la Tabla 2a.

Rai simplificó posteriormente su sistema de estadiaje en tres grupos (Rai, 1987), a los que denominó categorías de riesgo: riesgo bajo -correspondiente al estadio 0-, riesgo intermedio -estadios I y II-, y riesgo alto -estadios III y IV-. Esta simplificación fue debida a la demostración de tres, y no cinco patrones de supervivencia, según las curvas de supervivencia actuarial. Los grupos de riesgo

bajo, intermedio y alto constituyen aproximadamente el 30%, 60% y el 10% de los casos y se asocian con supervivencias medias de 10, 6 y 2 años respectivamente (Tabla 2b).

1.6.b. Clasificación de Binet

Distingue tres estadios, según la presencia o ausencia de anemia (hemoglobina <10g/dl) o trombocitopenia (plaquetas <100.000/mm³) y el número de territorios ganglionares afectados (Binet y col., 1981). Estos estadios se exponen en la Tabla 3.

Los estadios A, B y C representan el 60, 30 y 10% de los casos, con medias de supervivencia mayor de 10, 6 y 2 años, respectivamente.

Ambas clasificaciones han demostrado, ampliamente, la correlación entre los distintos estadios en ellas propuestos y las curvas de supervivencia de la LLC. En ambas, los factores pronósticos considerados derivan fundamentalmente de la objetivación de la carga tumoral creciente, desde mínimas acumulaciones -medulares y ganglionares- con escasa interferencia con la hemopoyesis, hasta la mieloptisis originada por la continua infiltración linfocitaria. La comparación entre ambos sistemas muestra, sin embargo, diferencias. Así pues, en la clasificación de Rai hay menos pacientes que se consideran en la categoría de riesgo bajo que en la de Binet; de ahí, que esos mismos pacientes, tengan una media de supervivencia mayor en ese sistema de estadiaje. El pronóstico de los pacientes de alto riesgo es similar en ambos sistemas (de Castro y col., 1994).

1.6.c. Otros sistemas de estadiaje

El Grupo Internacional de Estudio de la LLC (IWCLL) ha propuesto un sistema de estadiaje para la enfermedad, que se fundamenta en la integración de los sistemas de Binet y col., y de Rai y col. (International Workshop on CLL., 1981). Éste surge de la apreciación de que dentro de las categorías A, B y C de Binet, existen subgrupos de pacientes con historia natural y pronóstico diferente. Los estadios de dicha clasificación son: A(0), A(I), A(II), B(I), B(II), C(III), C(IV). Estudios posteriores han validado este sistema integrado (International Workshop on CLL., 1989; French Co-operative Group on CLL., 1990).

Varios autores han intentado mejorar los sistemas de estadiaje de la LLC expuestos en los apartados anteriores (Montserrat y Rozman, 1993). Los sistemas

TABLA 2a. SISTEMA DE ESTADIAJE DE RAI PARA LA LLC (1975)

Estadio	Criterios	Supervivencia mediana:meses
0	Linfocitosis en sangre y médula ósea	> 120
I	Linfocitosis y adenopatías	85
II	Linfocitosis y hepato y/o esplenomegalia	60
III	Linfocitosis y anemia (Hb < 11g/dl)	27
IV	Linfocitosis y trombocitopenia (plaquetas < 100x10 ⁹ /l)	16

TABLA 2b. SISTEMA DE ESTADIAJE DE RAI PARA LA LLC (1987)

Riesgo	Estadio	Linfocitos >15x10 ⁹ /l	Adenopatías	Organomegalias	Hb <11g/dl	Plaquetas <100x10 ⁹ /l
Bajo	0	+	-	-	-	-
Intermedio	I	+	+	-	-	-
Intermedio	II	+	±	+	-	-
Alto	III	+	±	±	+	-
Alto	IV	+	±	±	±	+

TABLA 3. SISTEMA DE ESTADIAJE DE BINET PARA LA LLC (1981)

Estadio	Criterios	Supervivencia mediana:meses
A	No anemia ni trombocitopenia Menos de tres áreas linfoides afectas *	> 120
B	No anemia ni trombocitopenia Tres o más áreas linfoides afectas	50
C	Anemia (Hb < 10 g/dl) y/o Trombocitopenia (plaquetas < 100x10 ⁹ /l)	24

* Se consideran cinco áreas linfoides distintas: hígado, bazo y los ganglios linfáticos de los territorios cervicales, axilares e inguinales (uni o bilaterales).

propuestos por ellos identifican de forma válida, grupos de pacientes con pronósticos diferentes, pero no añaden información a la suministrada por las clasificaciones de Rai y col., de Binet y col., y de la IWCLL que, además, cuentan con la ventaja de ser más simples y de más fácil aplicación.

1.7. Factores pronósticos

A pesar de las clasificaciones anteriores, es difícil pronosticar el curso individual de la enfermedad ya que, mientras en algunos pacientes la LLC-B tiene un curso indolente durante muchos años, en otros la enfermedad mantiene un curso agresivo y rápidamente progresivo. La necesidad de identificar criterios que predigan con exactitud el curso clínico de la enfermedad es de gran importancia en pacientes incluidos en los grupos de riesgo bajo e intermedio que en conjunto constituyen la mayoría de los pacientes con LLC-B (Rozman y Montserrat, 1995). Existen tres factores que pueden contribuir a esta tarea: el patrón de infiltración de la médula ósea (Rozman y col., 1984; Han y col., 1984), el tiempo de duplicación de linfocitos en sangre periférica (Montserrat y col., 1986), y el cariotipo (Han y col., 1984; Juliusson y col., 1985).

Biopsia de médula ósea

En la LLC-B se han descrito cuatro patrones de infiltración medular: focal o nodular, intersticial, mixta (nodular e intersticial) y difusa. En términos de pronóstico, los patrones mencionados se pueden clasificar en dos grandes grupos: difuso y no difuso. Los pacientes cuya biopsia de médula ósea revela un patrón de infiltración linfocitaria difuso tienen mayor probabilidad de tener un curso más agresivo que aquellos que presentan un patrón de infiltración no difuso -nodular o intersticial- (Rozman y col., 1984; Han y col., 1984).

Tiempo de duplicación linfocitaria

De igual forma, los enfermos que sin recibir terapia citotóxica presentan un tiempo de duplicación linfocitaria menor de 12 meses, tienen más riesgo de sufrir un curso agresivo frente a aquellos con un tiempo de duplicación superior a los 12

meses. Este hecho no puede ser valorado en el momento del diagnóstico (Montserrat y col., 1986).

Cariotipo

Por último, también es útil el examen del cariotipo, como ya se ha comentado. La supervivencia de los pacientes de LLC-B con cualquier anomalía clonal cromosómica es inferior a la de los pacientes con un cariotipo normal. La complejidad del cariotipo es el parámetro pronóstico más significativo. Así, las anomalías únicas se asocian con una supervivencia más prolongada que las anomalías múltiples. No obstante, la trisomía 12 como anomalía única, constituye un signo pronóstico adverso. Cuando se consideran todas las anomalías cromosómicas asociadas a la LLC-B en su conjunto, los pacientes con alteración en el cromosoma 14 son los que tienen el peor pronóstico (Juliusson y Gahrton, 1993; O'Brien y col., 1995).

Se han estudiado otros parámetros de la enfermedad, con el fin de ver si tienen significación pronóstica (edad, fenotipo de la LLC-B, etc) (Montserrat y Rozman, 1993). La mayoría de esos parámetros no son útiles para predecir la progresión, y no añaden más información a la obtenida del estadio clínico (Catovsky y Foa, 1990^b; de Castro y col., 1994).

1.8. Tratamiento

Momento de inicio

En primer lugar, es importante conocer cuándo se debe iniciar el tratamiento, para lo que es necesario encuadrar el proceso en uno de los estadios de la clasificación de Rai y de Binet. Asimismo, conviene conocer los factores pronósticos mencionados antes.

En un extremo están los pacientes que se presentan con lo que se ha denominado LLC "latente" o "de curso indolente". Son enfermos con afectación de menos de tres territorios ganglionares, patrón de infiltración de la médula ósea no difuso, hemoglobina igual o superior a 13 g/dl, número absoluto de linfocitos en sangre periférica igual o inferior a 30.000/ μ l, y tiempo de duplicación de los

linfocitos mayor de doce meses (Montserrat y col., 1988; French Co-operative Group on CLL, 1990). Este grupo de pacientes presenta una forma precoz de LLC, con poca probabilidad de progresión, y con una supervivencia similar a la de la población general sin la enfermedad. Por eso, no está indicado iniciar el tratamiento en este momento de la evolución (Gale y col., 1994).

Por otro lado, la mayoría de los grupos están de acuerdo en iniciar el tratamiento de forma inmediata, en los pacientes que presentan la enfermedad en estadios III y IV de Rai, o bien, C de Binet. Esto es así, debido al mal pronóstico de dichos enfermos, y en un intento de modificar la historia natural de la enfermedad.

Por último, no está bien definido el momento de iniciar el tratamiento en el resto de los pacientes. La mayoría de los centros lo hacen: cuando la enfermedad pasa, en su evolución, a ser estadio III y IV de Rai, o bien, C de Binet; cuando existe evidencia de progresión de la enfermedad o enfermedad activa; si se produce crecimiento progresivo o doloroso de los ganglios linfáticos; aparece hepatomegalia, esplenomegalia o linfadenopatías masivas; y desarrollo de fenómenos autoinmunes (Cheson y col., 1988).

Fármacos utilizados

Los fármacos que más frecuentemente se emplean en el tratamiento de la LLC son el clorambucil y la prednisona. Con frecuencia, se usan de forma conjunta, aunque es práctica habitual la administración del primero de los agentes de forma única, añadiendo el esteroide cuando el control de la enfermedad no es satisfactorio, aunque no existe evidencia de que la adición a éste de la prednisona mejore de forma significativa el porcentaje de respuesta o la supervivencia (Keating, 1991; Tefferi y Phyliky, 1992). La prednisona tiene su indicación en el tratamiento de la trombocitopenia y anemia autoinmune (Rozman y Montserrat, 1995).

Se han empleado otros regímenes poliquimioterápicos alternativos, que incluyen con frecuencia antraciclinas y ciclofosfamida: CHOP (Ciclofosfamida, Adriamicina, Vincristina, Prednisona), CAP (Ciclofosfamida, Adriamicina, Prednisona) y CVP (Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona). En estos estudios, se observa una alta tasa de respuesta en pacientes con LLC en estadio C de Binet, pero no existe evidencia de una mayor supervivencia de la encontrada con los fármacos tradicionales (Dighiero y col., 1991; Keating, 1991; O'Brien y col., 1995; Rozman y Montserrat, 1995).

En la última década han demostrado su utilidad clínica en el tratamiento de la LLC tres análogos de las purinas (Cheson, 1991; Rai, 1993): el Monofosfato de

Fludarabina, la Pentostatina o 2-Deoxicoformicina, y la 2-Cloro-deoxiadenosina. Los dos últimos se han empleado en pocos pacientes, por lo que no está definido su papel en el manejo de la enfermedad. El Monofosfato de Fludarabina, por el contrario, se considera un fármaco de enorme importancia dentro del arsenal terapéutico de la LLC y, actualmente, constituye el tratamiento de elección en las LLC resistentes a medicaciones convencionales (Keating, 1993; Gale y col., 1994; O'Brien y col., 1995).

Nuevos enfoques terapéuticos

Se están estudiando tratamientos con anticuerpos monoclonales anti-células B (Grossbard y col., 1992). También se ha empleado el trasplante alogénico de médula ósea, y en menor número de casos, el autotrasplante de células progenitoras de médula ósea o de sangre periférica. De todo ello existen, únicamente, resultados preliminares (Gale y col., 1994; O'Brien y col., 1995). La terapia con interferón alfa, así como con interleucina 2 recombinante, no ha mostrado resultados esperanzadores (Ziegler y col., 1989; Allison y col., 1989; O'Brien y col., 1995; Rozman y Montserrat, 1995).

Objetivo, duración y respuesta al tratamiento

Parece existir una relación entre la respuesta al tratamiento y la supervivencia de los pacientes con LLC que reciben medicación por primera vez. En este grupo, cuanto mayor es la reducción de la masa tumoral, más prolongado es el intervalo de tiempo libre de progresión de la enfermedad y mayor es la supervivencia. En consecuencia, el objetivo del tratamiento debería ser alcanzar la mejor respuesta posible con el menor grado de toxicidad (Montserrat, 1992).

La duración óptima del tratamiento en los enfermos con LLC-B no se ha establecido, y depende tanto del fármaco utilizado como de la valoración de la respuesta al mismo (Cheson y col., 1988; International Workshop on CLL., 1989).

2. CITOCINAS Y LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B

2.1. Introducción

Las citocinas son glicoproteínas constituidas por 100 a 200 aminoácidos y un peso molecular entre 15 y 25 kilodaltons, que controlan la comunicación intercelular en una gran variedad de procesos que, a su vez, intervienen en el control de la respuesta inmune, inflamatoria, en la hematopoyesis, en las vías neuroendocrinas, etc.

Cada vez es más evidente el hecho de que factores solubles pueden jugar un papel relevante en la patogénesis y/o en el curso clínico de las neoplasias hematológicas, a través de caminos complejos e interconectados. Esto viene dado en gran parte del reconocimiento que, tanto la diana de muchas citocinas y, por tanto, la expresión de sus receptores, y las poblaciones celulares capaces de producir tales factores, son más numerosos de lo que en principio se creyó.

El pleiotropismo funcional y la redundancia son rasgos característicos de las citocinas. Pleiotropismo es la propiedad de estas proteínas, las cuales, producidas por diferentes tipos celulares, tienen también su acción sobre células muy distintas. Por redundancia entendemos el que diversas citocinas realicen acciones idénticas. Además del pleiotropismo funcional y de la redundancia, las citocinas tienen en común otra serie de propiedades, como son:

1- Se producen durante la fase efectora de la inmunidad natural y específica y sirven para mediar y regular las respuestas inflamatorias e inmunes.

2- La secreción de citocinas es un suceso breve y autolimitado. Por lo general, su síntesis se inicia por la transcripción de genes y no están almacenadas como moléculas preformadas. Tal activación transcripcional es habitualmente transitoria y los ARNm de las citocinas son inestables y de corta vida. Una vez sintetizadas, las citocinas se secretan rápidamente.

3- Cada citocina es producida por varias líneas celulares. De ahí que el nombre más correcto para estas proteínas no sea el de linfocinas o monocinas sino el de citocinas.

4- Influyen en la síntesis de otras citocinas, lo que conduce a cascadas, en las que una segunda o tercera citocina puede mediar en las acciones biológicas de la primera.

5- Influyen, con frecuencia, en la acción de otras citocinas. Así, dos citocinas pueden interactuar para antagonizarse en su acción, para producir efectos aditivos e incluso sinérgicos.

6- Las citocinas tienen, a menudo, efectos diferentes sobre la misma diana celular.

7- Al igual que otras hormonas polipeptídicas, inician su acción cuando se unen a receptores específicos en la superficie de las células diana. Estas células diana, sobre las que realiza su acción una citocina, puede ser la misma que la secreta (acción autocrina), una célula cercana (acción paracrina) o, -como hormonas verdaderas-, una célula distante (acción endocrina, a través de la circulación). Los receptores para las citocinas muestran, con frecuencia, una alta afinidad para sus ligandos. Como consecuencia, se precisa una cantidad muy pequeña de citocina para conseguir su efecto biológico.

8- La expresión de muchos receptores de citocinas se regula mediante señales específicas. Estas señales pueden ser otras citocinas o incluso la misma citocina que se une al receptor.

9- La mayoría de las respuestas celulares a las citocinas son lentas y ocurren a lo largo de un periodo de horas.

10- Para muchas células diana, las citocinas actúan como elementos que regulan la división celular, es decir, como factores de crecimiento (Abbas y col., 1994).

A continuación, se exponen brevemente los trabajos más representativos que analizan la acción de diversas citocinas en la LLC-B. Las que mayor interés han suscitado a lo largo de los últimos años son: el factor de necrosis tumoral, la interleucina 2 y la interleucina 4.

2.2. Factor de necrosis tumoral alfa

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , del inglés "Tumor Necrosis Factor") es el mediador principal de la respuesta del huésped frente a las bacterias gram-negativas. La fuente celular más importante de esta citocina es el monocito activado por lipopolisacárido. Los linfocitos B y T normales pueden liberar TNF α tras su

activación, pero esto no se ha demostrado en células sin activar (Foa y col., 1990). El TNF α induce la síntesis de ADN en los linfocitos B normales, estimulados con anti-IgM o SAC (Banchereau y Rousset, 1992) y estimula la producción de IgE en los linfocitos B activados a través de un anticuerpo anti-CD40 (Banchereau y col., 1994). Los receptores del TNF α (R-TNF α) están presentes en casi todas las células estudiadas y su expresión aumenta de forma evidente tras la activación del linfocito B (Banchereau y Rousset, 1992). Las células activadas secretan los R-TNF α : son los receptores solubles (Abbas y col., 1994).

Expresión constitutiva del gen del TNF α

El TNF α se expresa de forma constitutiva en los linfocitos B de la LLC-B (Burke y col., 1993; Larsson y col., 1993; Plate y col., 1993_b; Rambaldi y col., 1993; Di Celle y col., 1994).

Acción del TNF α sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B

El TNF α tiene acciones contrapuestas sobre el crecimiento celular dependiendo de la diana estudiada. Así, el TNF α inhibe la proliferación de numerosas líneas tumorales, entre ellas la leucemia mieloide crónica (Dumcombe y col., 1989). Sin embargo, la mayor parte de los autores atribuyen al TNF α una acción de supervivencia y de inducción al crecimiento en la LLC-B, bien de forma aislada (Bianchi y col., 1988; Cordingley y col., 1988; Digel y col., 1989; Moberts y col., 1989; Digel y col., 1991; Trentin y col., 1993; Van Kooten y col., 1993_d; Jabbar y col., 1994; Reittie y Hoffbrand, 1994), en asociación a un éster del forbol (Nilsson y col., 1992; Van Kooten y col., 1992; Larsson y col., 1993; Van Kooten y col., 1993_b), o a la IL-2 (Trentin y col., 1994), o a la IL-7 (Digel y col., 1991) o tras activación con SAC₁ (Álvarez-Mon y col., 1993; Larsson y col., 1993). El estímulo de la proliferación es dosis-dependiente, y se puede suprimir por completo al añadir al medio de cultivo un anticuerpo monoclonal frente al TNF α (Digel y col., 1989; Trentin y col., 1993), o frente al receptor de esa citocina (Waage y col., 1992; Trentin y col., 1993), y con la adición de la IL-4 (Van Kooten y col., 1992; Reittie y Hoffbrand, 1994), de la IL-6 (Aderka y col., 1993; Van Kooten y col., 1993_b), o del interferón alfa (Cordingley y col., 1988). La síntesis de ADN observada conduce a la división celular (Digel y col., 1989). La inducción al crecimiento del TNF α en la LLC-B

no es uniforme en todos los pacientes y se ha asociado, en ocasiones, a una forma más agresiva de la enfermedad (Aderka y col., 1993).

Dentro de la heterogeneidad que caracteriza a la LLC-B, hay pacientes en los que el TNF α , no sólo no estimula la proliferación celular (Carlsson y col., 1989; Jewell y col., 1993), sino que la inhibe, acción que revierte al añadir un anticuerpo frente al TNF α (Foa y col., 1990). La acción del TNF α en la LLC-B no se correlaciona con la expresión variable de los antígenos de activación en las células leucémicas al inicio del cultivo (Digel y col., 1989). La acción estimuladora de esta citocina se observa también, y de forma fundamental en la LCP (Digel y col., 1989; Trentin y col., 1993).

El TNF α induce, en combinación con un éster del forbol, la adherencia de las células B de la LLC-B, que adquieren la apariencia de célula dendrítica; este fenómeno se acompaña del aumento de expresión de las integrinas β_1 y β_2 (van Kooten y col., 1993_c). El TNF α aumenta la expresión del ARNm del antígeno de activación CD23 en los linfocitos B de la LLC-B (Fournier y col., 1992).

El TNF α no induce la diferenciación de los linfocitos de la LLC-B (Digel y col., 1989; Fluckiger y col., 1992), a menos que se emplee asociado con un éster del forbol (Van Kooten y col., 1993_b).

Expresión de los receptores del TNF α en la membrana de los linfocitos de la LLC-B y detección del receptor soluble del TNF α

Las células de la LLC-B, al igual que las de la LCP, expresan de forma constitutiva los R-TNF α de alta afinidad -p75- y de baja afinidad -p55- (Waage y col., 1992), a diferencia de los linfocitos B de las personas sanas (Nilsson y col., 1992; Waage y col., 1992; Trentin y col., 1993; Trentin y col., 1994). La expresión del receptor de la citocina no varía en contacto con el TNF α , TNF β , IL-2 ni con el factor de crecimiento de las células B (Trentin y col., 1993), pero sí tras el contacto con un éster del forbol (Larsson y col., 1993). No se observa relación entre la extensión de la proliferación inducida por TNF α y la densidad de los receptores de membrana (Digel y col., 1989). Estos R-TNF α son funcionalmente normales puesto que la adición de un anticuerpo monoclonal frente al R-TNF α induce la proliferación de los linfocitos tumorales de la LLC-B y de la LCP (Trentin y col., 1993).

Se ha objetivado también un aumento de los receptores del TNF α en el suero de los pacientes con LLC-B (Digel y col., 1992; Waage y col., 1992).

Presencia del TNF α en el suero de los pacientes y producción de la citocina por las células de la LLC-B en cultivo

El TNF α no se detecta en el suero de personas sanas y sí en enfermos con LLC-B y LCP. Los niveles séricos de TNF α están elevados en los pacientes en que se diagnostica la LLC-B, pasando a ser normales al alcanzar la remisión de la enfermedad (Morabito y col., 1993). De igual forma, en las personas con LCP tratadas con interferón alfa, los niveles séricos de TNF α disminuyen o se normalizan en paralelo a la desaparición de células peludas circulantes (Foa y col., 1990). El TNF α se encuentra elevado en el suero de los pacientes con LLC-B en todos los estadios clínicos de la misma, aunque el nivel aumenta en relación al estadio de la enfermedad (Adami y col., 1994).

Se ha observado una producción y secreción *in vitro* del TNF α por parte de las células tumorales de la LLC-B (Burke y col., 1993; Reittie y Hoffbrand, 1994), que aumentan tras la activación de los linfocitos leucémicos con un éster del forbol o con SAC₁, además de la estimulación con IL-2 (Nilsson y col., 1992; Van Kooten y col., 1992; Larsson y col., 1993). El nivel de TNF α en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos B de pacientes con LLC-B varía según los estadios de la enfermedad (Hahn y col., 1989). La producción de la citocina disminuye tras tratamiento de las células con interferón alfa (Burke y col., 1993), o tras introducir IL-4 *in vitro* (Reittie y Hoffbrand, 1994). Se ha demostrado también que los monocitos de los pacientes con LLC-B presentan un déficit funcional, que se manifiesta en la producción disminuida de TNF α al ser estimulados con lipopolisacárido o con SAC (Dahlke y col., 1995).

Acción del TNF α sobre la apoptosis en la LLC-B

El TNF α no protege de la apoptosis a las células de esta neoplasia hematológica (Dancescu y col., 1992; Jewell y col., 1993; Rojas y col., 1994).

El hecho de que el cultivo de las células de la LLC-B con el TNF α induzca la expresión del ARNm de la citocina y la secreción de esta proteína por parte de los linfocitos B tumorales (Bianchi y col., 1988; Cordingley y col., 1988), junto con el resto de los datos arriba enumerados, sugiere que el TNF α puede actuar como un factor autocrino coestimulador para las células de esta entidad neoplásica (Nilsson y col., 1992; Van Kooten y col., 1992; Hoffbrand y col., 1993; Larsson y col., 1993).

Igualmente, se ha atribuido al TNF α un papel inhibitor de la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas en la LLC-B (Michalevicz y col., 1991).

2.3. Interleucina 1

La interleucina 1 (IL-1) se conoció inicialmente como un polipéptido derivado de los monocitos, que aumentaba la respuesta de los linfocitos T frente a un estímulo antigénico. Tiene dos formas, la IL-1 α y la IL-1 β , producidas por dos genes diferentes. Mientras que la IL-1 α está preferentemente asociada a la membrana de las células, la IL-1 β se secreta principalmente. La fuente celular más importante la constituye el monocito activado. Los receptores para esta citocina están presentes en casi todas las células estudiadas. La función principal de la IL-1 es ser mediadora de la respuesta inflamatoria del huésped en la inmunidad natural. Aumenta la proliferación de las células CD4, demostrándose la transcripción del gen de la IL-2 y la expresión del receptor de la IL-2. La IL-1 estimula el crecimiento (Banchereau y col., 1994) y diferenciación de la célula B. Por último, esta citocina actúa sobre una diversidad de células que funcionan como efectoras de las respuestas inmunes, entre ellas los propios monocitos, para que aumenten la síntesis de IL-1 e induzcan la secreción de IL-6 (Di Giovine y Duff, 1990). La actividad de la IL-1 viene modulada por la proteína antagonista del receptor de dicha citocina (Arend, 1993). La IL-1 estimula la recuperación hemopoyética *in vivo* actuando, probablemente, sobre las células progenitoras hematopoyéticas e interactuando sinérgicamente con otras citocinas (Quesenberry, 1995).

Expresión constitutiva del gen

El gen de la IL-1 β se expresa de forma constitutiva en las células de la LLC-B (Di Celle y col., 1994), aunque este hallazgo no es unánime (Burke y col., 1993; Kurzrock y col., 1993; Rambaldi y col., 1993). No se ha detectado el ARNm de la IL-1 α en los linfocitos B de la LLC-B (Plate y col., 1993b; Di Celle y col., 1994).

Acción de la IL-1 sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B

La IL-1 β juega un papel significativo en la activación y en la diferenciación de las células de diversas neoplasias de estirpe hematológica B, pero sólo un papel menor en la de los linfocitos B de la LLC-B, en los que no induce proliferación (Uggla y col., 1987; Carlsson y col., 1989; Aguilar-Santelises y col., 1991; Digel y col., 1991; Fluckiger y col., 1992; Jewell y col., 1993; Brizard y col., 1994; Takeuchi y Katayama, 1994) ni producción de inmunoglobulinas (Carlsson y col., 1989; Fluckiger y col., 1992).

La IL-1 α tampoco induce la proliferación celular en la LLC-B (Digel y col., 1991; Van Kooten y col., 1992). La producción de IL-1 α por parte de las células B de esta neoplasia, se ha relacionado con la fibrosis de la médula ósea asociada ocasionalmente a la enfermedad (Kimura y col., 1993).

Puesto que la IL-1 no induce la síntesis de ADN en las células B de la LLC-B, es improbable que esta citocina sea un factor de crecimiento autocrino importante en esta enfermedad, al menos actuando de forma aislada (Hoffbrand y col., 1993).

Expresión del receptor de la IL-1 en la membrana de los linfocitos de la LLC-B

La IL-1 α se expresa en la membrana de la mayoría de las células de los pacientes con LLC-B e implica la activación del linfocito B. El porcentaje de IL-1 α detectado en la superficie de las células leucémicas es significativamente mayor en pacientes en estadio 0 de la clasificación de Rai y en pacientes con menor grado de afectación clínica, y su expresión aumenta tras la activación de la tirosín-quinasa por el empleo de un éster de forbol (Aguilar-Santelises y col., 1993).

También se detecta el receptor de la IL-1 β en los linfocitos B de la LLC-B y en los linfocitos B CD5 (+) de personas sanas (Plate y col., 1992; Plate y col., 1993b).

Presencia de la IL-1 en el suero de los pacientes y producción de la citocina por las células de la LLC-B en cultivo

Se ha encontrado aumentada la IL-1 α en el suero de pacientes con LLC-B, de forma leve, pero significativa (Aguilar-Santelises y col., 1992).

Los linfocitos B de la LLC-B producen IL-1 β de forma espontánea (Pistoia y col., 1986), y esta producción es más baja en los estadios avanzados de la enfermedad (Aguilar-Santelises y col., 1989; Aguilar-Santelises y col., 1991). La secreción de la citocina se asocia, en una única publicación, a la expresión anómala de antígenos de la estirpe mielomonocítica en las células neoplásicas (Morabito y col., 1987). Sin embargo, el método empleado por los autores no es específico para la detección de la IL-1 (Abbas y col., 1994). Se ha detectado la secreción de IL-1 α en cantidad escasa (Aguilar-Santelises y col., 1991).

Acción de la IL-1 sobre la apoptosis en la LLC-B

La IL-1 α no inhibe la apoptosis espontánea de las células de esta neoplasia (Dancescu y col., 1992; Mainou-Fowler y col., 1992; Buschle y col., 1993; Rojas y col., 1994). La IL-1 β reduce la muerte celular programada de los linfocitos B de la LLC-B (Jewell y col., 1993).

2.4. Interleucina 2

La interleucina 2 (IL-2) se ha denominado factor de crecimiento de las células T y es la citocina más implicada en la progresión de los linfocitos T, de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular. Esta citocina es el factor autocrino de crecimiento más importante para los linfocitos T y la cantidad de IL-2 sintetizada por los linfocitos CD4 activados se relaciona con la magnitud de la respuesta inmune. La IL-2 estimula el crecimiento de las células NK e incrementa su función citolítica, dando lugar a las células asesinas activadas por citocinas (LAK). La IL-2 actúa sobre las células B humanas como un factor de crecimiento y estímulo para la síntesis de anticuerpos (Smith, 1988; Smith, 1989; Banchereau y Rousset, 1992).

Los receptores de la IL-2 (R-IL2) de alta afinidad aparecen en la superficie de los linfocitos B normales de sangre periférica, cuando se les estimula con agentes

activadores del tipo SAC, éster del forbol, anti-inmunoglobulinas y "pokeweed mitogen". También está presente en los linfocitos T activados y en otras estirpes celulares. Este R-IL2 de alta afinidad está constituido por la interrelación de, al menos, dos cadenas: R-IL2 α (CD25) y R-IL2 β (Burton y Kay, 1994).

Expresión de los receptores de la IL-2 en la membrana de los linfocitos de la LLC-B y detección del receptor soluble de la IL-2

De forma más reciente, se ha sabido que las células de la LLC-B y de la LCP expresan el receptor de la IL-2 en su superficie, en porcentaje variable, dependiendo en gran medida del sistema de detección empleado. Así, más del 50% de los pacientes con LLC-B expresan la subunidad α (Kay y col., 1988; Aguilar-Santelises y col., 1993; Plate y col., 1993_b; Tsilivakos y col., 1994; Nakase y col., 1994) y la β del R-IL2 (Yagura y col., 1990; Burton y Kay, 1994). Se hipotetiza que la presencia de una masa en expansión de células B tumorales, portadoras de R-IL2 de alta afinidad, puede contribuir de forma significativa a la inmunodeficiencia asociada a la LLC-B (Semenzato y col., 1987; Kay y col., 1988; Burton y Kay, 1994). El TNF α aumenta la expresión de la subunidad α del receptor de la IL-2 en los linfocitos B leucémicos (Trentin y col., 1994).

De igual forma que otras células que expresan el R-IL2 α , las células de la LLC-B elaboran la forma soluble de esta cadena (Rs-IL2 α) *in vitro* (Kay y col., 1988). Probablemente ocurre algo semejante *in vivo*, puesto que la LLC-B, así como la LCP, se caracterizan por tener niveles séricos elevados del Rs-IL2 α , cuyo origen está en los linfocitos tumorales (Kay y col., 1988; Beguin y col., 1993). En general, los niveles séricos del Rs-IL2 α se correlacionan con la actividad de la enfermedad en la LLC-B, siendo útiles como marcador del estadio, del pronóstico, e incluso del subtipo celular -B o T- de esta neoplasia (Semenzato y col., 1987; Barak y col., 1992; Srivastava y col., 1994). La presencia de niveles séricos elevados del Rs-IL2 α y la producción de ese receptor por parte de las células de la LLC-B, sugieren que los linfocitos B de esta neoplasia hematológica son células activadas para producir y luego secretar el R-IL2 (Kay y col., 1988).

Acción de la IL-2 sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B

No existe evidencia de que la IL-2 funcione como un factor de crecimiento autocrino o paracrino en la LLC-B, a pesar de que las células de esta enfermedad tienen receptores de un tamaño normal y con capacidad de unión también normal. Tampoco está claro que la IL-2 sea un factor de crecimiento *in vitro* o *in vivo* para las células B malignas de forma consistente (Álvarez-Mon y col., 1989; Hoffbrand y col., 1993; Burton y Kay, 1994). La respuesta proliferativa a la IL-2 por parte de las células de la LLC-B es heterogénea (Karray y col., 1988_c; Digel y col., 1991; Van Kooten y col., 1992; Hoffbrand y col., 1993; Aguilar-Santelises y col., 1994; Tsilivakos y col., 1994), e independiente de la expresión del R-IL2 en la membrana celular de las mismas (Yagura y col., 1990). La producción endógena de esta citocina se ha relacionado con la proliferación espontánea de las células leucémicas (Touw y col., 1987). Sin embargo, no se detecta la expresión constitutiva del gen de la IL-2 en los linfocitos B de la LLC-B de forma consistente (Plate y col., 1993_b; Di Celle y col., 1994).

La IL-2 aumenta la expresión del ARNm del antígeno de activación CD23 en los linfocitos B de la LLC-B (Hivroz y col., 1989; Fournier y col., 1992).

La IL-2 induce la secreción de inmunoglobulinas en las células de la LLC-B en reposo (Tremisi y Bich-Thuy, 1991; Poljak y col., 1993) y estimuladas con SAC (Fluckiger y col., 1992; Fluckiger y col., 1993), o bien con "pokeweed mitogen" (Poljak y col., 1993).

Acción de la IL-2 sobre la apoptosis en la LLC-B

La IL-2 protege a los linfocitos B de la LLC-B de la muerte celular programada *in vitro*, de forma dosis dependiente (Jewell y col., 1993; Huang y col., 1993; Zinzani y col., 1994), aunque esta observación no es uniforme (Dancescu y col., 1992; Buschle y col., 1993; Rojas y col., 1994). No se ha objetivado una acción citotóxica de la IL-2 sobre las células de la LLC-B (Zinzani y col., 1994).

2.5. Interleucina 3

La interleucina 3 (IL-3) es conocida como factor estimulante de colonias multilineal (Saeland y col., 1992; Abbas y col., 1994; Quesenberry, 1995). Es producida por los linfocitos CD4 y actúa sobre la mayoría de los progenitores inmaduros de la médula ósea promoviendo su diferenciación. Tiene acción sinérgica con la IL-7.

Expresión constitutiva del gen de la IL-3

Las células de la LLC-B no expresan de forma constitutiva el gen de la IL-3 (Di Celle y col., 1994).

Acción de la IL-3 sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B

Se ha establecido una línea celular, a partir de un paciente con LLC-B en fase de transformación, que prolifera en presencia de la IL-3 (Thoda y col., 1991), pero los linfocitos del enfermo en la etapa de la enfermedad sin transformación no respondían a la citocina (Caligaris-Cappio y col., 1989; Digel y col., 1991; Thoda y col., 1991; Trentin y col., 1994). Se ha observado que la IL-3 no aumenta la expresión del antígeno de activación CD23 (Fournier y col., 1992).

La IL-3 no induce la diferenciación de las células de la LLC-B (Fluckiger y col., 1992), aunque puede tener importancia en la regulación de la hematopoyesis en esta enfermedad (Michalevich y col., 1991).

Expresión de los receptores de la IL-3 en la membrana de los linfocitos de la LLC-B

Los linfocitos B de la LLC-B presentan en su membrana los receptores de la IL-3, cuya expresión aumenta en contacto con la IL-2 (Trentin y col., 1994).

Acción de la IL-3 sobre la apoptosis en la LLC-B

La IL-3 no tiene un efecto protector de la apoptosis en las células de la LLC-B (Dancescu y col., 1992).

2.6. Interleucina 4

La interleucina 4 (IL-4) es una citocina derivada del linfocito T CD4 (+). Se identificó en principio como un factor de crecimiento de la célula B. Estimula la proliferación de los linfocitos B humanos previamente activados, pero antagoniza la acción de la IL-2 sobre esas mismas células (Paul y Ohara, 1987; Kishimoto y Hirano, 1988; Banchereau y Rousset, 1992). Posteriormente se ha conocido que la IL-4 es un factor de activación para los linfocitos B, los cuales expresan niveles altos del antígeno CD23, cuando están en cultivo con la citocina y un anticuerpo anti-CD40 (Banchereau y col., 1994). Asimismo, la IL-4 induce la producción de inmunoglobulina E y bloquea la síntesis de IFN γ (Abbas y col., 1991; Banchereau y col., 1994). Los receptores de esta citocina se detectan, mediante citometría de flujo, en los linfocitos B activados (Kishimoto y Hirano, 1988; Banchereau y Rousset, 1992).

Expresión constitutiva del gen de la IL-4

Se ha detectado la presencia del ARNm de la citocina en los linfocitos T (Dancescu y col., 1992) y en los linfocitos B de la LLC-B en situación basal (Plate y col., 1993_b). Por el contrario, y de forma más reciente, Di Celle y col., 1994, no detectan el ARNm de la IL-4 en las células B leucémicas.

Acción de la IL-4 sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B

Al contrario de la acción más comúnmente admitida para el TNF α en la LLC-B, la mayoría de los autores coinciden en apoyar un efecto antiproliferativo para la IL-4 en esta enfermedad. En esto se asemeja a la forma de actuar de esta citocina en

otras neoplasias hematológicas (Defrance y col., 1992; Akashi, 1993; Jansen y col., 1993).

En resumen, la IL-4 inhibe tanto la proliferación espontánea de las células B de la LLC-B (Luo y col., 1991; Reittie y Hoffbrand, 1994), la que se encuentra tras activación con anti-IgM o con SAC (Carlsson y col., 1989; Fluckiger y col., 1994), como la inducida por otras citocinas -el TNF α (Luo y col., 1991; Van Kooten y col., 1992; Van Kooten y col., 1993_b; Reittie y Hoffbrand, 1994), el IFN α (Luo y col., 1991), el IFN γ asociado a la IL-2 (Karray y col., 1988_c), la IL-2 (Karray y col., 1988_a; Karray y col., 1988_c; Galanaud y col., 1990; Luo y col., 1991; Van Kooten y col., 1992) y el factor de crecimiento de las células B de bajo peso molecular (Luo y col., 1991)-.

Otros estudios no observan acción de la IL-4 sobre el crecimiento celular leucémico (Karray y col., 1988_c; Carlsson y col., 1989; Kawano y col., 1989; Digel y col., 1991; Van Kooten y col., 1992; Jewell y col., 1993). Sin embargo, se objetiva un estímulo de la síntesis de ADN al utilizar un anticuerpo monoclonal anti-CD40 para conseguir la activación de la célula de la LLC-B (Fluckiger y col., 1992; Crawford y Catovsky, 1993; Fluckiger y col., 1994).

La IL-4 inhibe la liberación espontánea de la IL-6 y del TNF (Reittie y Hoffbrand, 1994). La IL-4 aumenta la expresión de las moléculas de activación en los linfocitos B de esta neoplasia, entre ellas el antígeno de superficie CD23 (Hivroz y col., 1989; Galanaud y col., 1990; Sarfati, 1993; Fluckiger y col., 1994).

La acción de la IL-4 sobre la diferenciación de la célula leucémica es controvertida. Mientras que unos autores atribuyen a la citocina una acción positiva (Van Kooten y col., 1993_a; Van Kooten y col., 1993_b), otros observan que la IL-4 no induce la diferenciación en la LLC-B (Karray y col., 1988_a; Carlsson y col., 1989; Luo y col., 1991; Fluckiger y col., 1992). La IL-4 no estimula la producción de IgE en los linfocitos B de esta neoplasia (Nusslein y col., 1993; Van Kooten y col., 1993_b), y además inhibe la diferenciación inducida por la IL-2 en las células leucémicas (Galanaud y col., 1990).

Presencia de IL-4 en el suero de pacientes con LLC-B

Se encuentran niveles elevados de IL-4 en el suero de pacientes con LLC-T, a diferencia de otras neoplasias de estirpe celular T (Raziuddin y col., 1994). No se ha estudiado en pacientes con LLC-B.

Expresión del receptor de la IL-4 en la membrana de los linfocitos de la LLC-B

Las células B de la LLC-B expresan el receptor de la IL-4 (Gilleece y col., 1993; Fluckiger y col., 1994).

Acción de la IL-4 sobre la apoptosis

La IL-4 inhibe la apoptosis espontánea (Dancescu y col., 1992; Panayiotidis y col., 1993_a; Panayiotidis y col., 1993_b; Craig y col., 1993; Fluckiger y col., 1994; Mainou-Fowler y col., 1994; Panayiotidis y col., 1994_b; Zinzani y col., 1994) y la inducida por hidrocortisona (Dancescu y col., 1992; Craig y col., 1993; Panayiotidis y col., 1994_b), por los análogos de la adenosina (Tanghe y col., 1994), o por la IL-5 (Mainou-Fowler y col., 1994) en pacientes con LLC-B. El tratamiento de las células de la LLC-B con IL-4 va acompañada de un aumento en la expresión de la proteína bcl-2 (Dancescu y col., 1992). El efecto de la IL-4 sobre la apoptosis, en la LLC-B, es específico de esta citocina, pues se suprime en presencia de un anticuerpo frente a la IL-4 (Mainou-Fowler y col., 1994).

Sólo Jewell y col., 1993, y Rojas y col., 1994, encuentran que la IL-4 no reduce de forma significativa el nivel de apoptosis en la LLC-B.

La IL-4 no modifica la expresión del antígeno Fas (CD95) en la membrana de los linfocitos B de la LLC-B (Panayiotidis y col., 1994_a). Este antígeno transmite una información de muerte celular programada cuando se une con anticuerpos monoclonales.

Estos datos sugieren que la IL-4 juega un papel esencial en la patogénesis de la enfermedad, al impedir tanto la proliferación como la muerte de las células tumorales.

2.7. Interleucina 7

La interleucina 7 (IL-7) es un factor de crecimiento hematopoyético para células B tempranas; estimula la proliferación de células pre-B y pro-B, pero no de

los linfocitos B maduros (Namen y col., 1988; Henney, 1989; Saeland y col., 1992), y no induce su diferenciación (Lee y col., 1989). La IL-7 estimula a los progenitores de la célula T y actúa como factor de crecimiento para timocitos, linfocitos T humanos maduros y clones de células T (Kincade, 1992). Los trabajos que intentan relacionar a esta citocina con la fisiopatología de la LLC-B son escasos (Digel y col., 1991; Frishman y col., 1993; Plate y col., 1993_a).

Expresión constitutiva del gen de la IL-7

Se detecta la expresión del ARNm de la IL-7 en las células de la LLC-B y no en linfocitos B de personas sanas (Plate y col., 1992; Frishman y col., 1993; Plate y col., 1993_a; Plate y col., 1993_b). El gen de la IL-7 y su ARNm disminuyen su expresión en las células leucémicas tras cuatro horas en cultivo; esto no se altera tras la adición de IL-7 exógena. La disminución en la expresión del gen de la IL-7 y del ARNm de la IL-7 precede a la apoptosis de las células de la LLC-B en cultivo en 12 a 18 horas (Plate y col., 1993_a). Por el contrario, di Celle y col., 1994, no encuentran la expresión del ARNm de la IL-7 en los linfocitos B de la LLC-B.

Acción de la IL-7 sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B

La IL-7 induce la proliferación de las células de la LLC-B de forma dosis-dependiente, sin requerir la adición de factores coestimuladores. Se detectan mitosis exclusivamente en los cultivos estimulados con IL-7, lo que indica que la síntesis de ADN inducida por IL-7 conduce a la división celular. La inducción al crecimiento se suprime por completo al añadir al medio un anticuerpo específico frente a la citocina. (Digel y col., 1991). La IL-7 induce la expresión del receptor de alta afinidad de la IL-2 en las células de la LLC-B. Sin embargo, la proliferación inducida por IL-7 no depende de la IL-2, pues no se ve afectada al añadir un anticuerpo frente a la IL-2. La inducción al crecimiento de la IL-7 tampoco se ve afectada por la IL-4, la IL-6 o el TNF α por iguales motivos, y la combinación de citocinas -IL-7 e IL-2 o TNF α - tiene un efecto aditivo en su estímulo de proliferación. Los antígenos de activación CD25 se expresan heterogéneamente en las células de la LLC-B, lo que sugiere que la capacidad de proliferar en respuesta a la IL-7 no viene asociada por la expresión de estos antígenos. Por último, la capacidad de unirse a la IL-7 marcada con un isótopo se correlaciona con la proliferación inducida por IL-7,

sugiriendo que una interacción directa ligando-receptor es responsable de la respuesta proliferativa (Digel y col., 1991).

El efecto positivo de la IL-7 sobre la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B no es objetivado por otros autores (Fluckiger y col., 1992). La IL-7 no aumenta la expresión del antígeno CD23 en las células leucémicas (Fournier y col., 1992).

La IL-7 no induce la diferenciación del linfocito B de la LLC-B (Fluckiger y col., 1992).

Expresión de los receptores de la IL-7 en la membrana de los linfocitos de la LLC-B

La expresión del receptor de la IL-7 se observa únicamente en pacientes con LLC-B y no en controles (Digel y col., 1991; Plate y col., 1992; Frishman y col., 1993). El receptor de la IL-7 permanece intacto tras cuatro horas en cultivo (Plate y col., 1993a).

Producción de la IL-7 por las células de la LLC-B en cultivo

Los linfocitos B de la LLC-B, a diferencia de los linfocitos B normales, producen IL-7 (Plate y col., 1992; Plate y col., 1993a).

Acción de la IL-7 sobre la apoptosis en la LLC-B

La IL-7 no inhibe la apoptosis de las células de la LLC-B (Digel y col., 1991; Dancescu y col., 1992; Buschle y col., 1993).

2.8. Interleucina 8

La interleucina 8 (IL-8) es un activador potente de los neutrófilos. Pertenece a la familia de las citocinas inflamatorias de bajo peso molecular (Baggiolini y col., 1994). Otra de estas citocinas es la proteína quemotáctica de los monocitos 1 (MCP-1, del inglés "monocyte chemotactic protein-1").

Expresión constitutiva del gen de la IL-8

Las células de la LLC-B expresan, en situación basal y de forma marcada, el ARNm de la IL-8 (Tobler y col., 1993; Di Celle y col., 1994). Este resultado contrasta con el obtenido en células normales de amígdala CD5 (+), en las que Di Celle y col., 1994, sólo detectan el ARNm de la IL-8 en dos de nueve muestras estudiadas.

Expresión de los receptores de la IL-8 en la membrana de los linfocitos de la LLC-B

No se observa la expresión del receptor de la IL-8 (Tobler y col., 1993).

Presencia de la IL-8 en el suero de los pacientes y producción de la citocina por las células de la LLC-B en cultivo

Se encuentran niveles elevados de IL-8 en el suero de pacientes con LLC-B (Di Celle y col., 1994).

Estas células liberan IL-8 de forma espontánea y, más todavía tras estimulación. Esta IL-8 purificada de los sobrenadantes de células en cultivo de LLC-B es bioactiva en un ensayo quimiotáctico para neutrófilos y esa actividad se inhibe, de forma específica, en presencia de un anticuerpo anti-IL-8. La cantidad de IL-8 liberada por los linfocitos normales de amígdala CD5 (+), no estimulados, es significativamente menor que la de las células de LLC-B, lo que hace pensar en un estado de activación del clon leucémico (Di Celle y col., 1994).

2.9. Interleucina 10

La interleucina 10 (IL-10) induce la proliferación y, sobre todo, la diferenciación de los linfocitos B normales humanos previamente activados, y es menos activa en este sentido que la IL-2 y la IL-4. Induce la producción de IgG4 (Banchereau y Rousset, 1992; Rousset y col., 1992; Moore y col., 1993; Abbas y col., 1994; Banchereau y col., 1994; Mosmann, 1994). Además, inhibe la síntesis de

citocinas por parte de las células T, y aumenta el número y la función de los linfocitos T citotóxicos (Quesenberry, 1995).

Expresión constitutiva del gen de la IL-10

Las células de la LLC-B expresan en situación basal niveles bajos del ARNm de la IL-10 (Finke y col., 1993; Plate y col., 1993b).

Acción de la IL-10 sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B

La IL-10 inhibe en más de un 50% la síntesis espontánea de ADN de las células de la LLC-B, y reduce en más de un 30% la síntesis de ADN en los linfocitos leucémicos activados -tras el empleo de un anticuerpo anti-IgM o de partículas de SAC, usados solos o en combinación con IL-2-. El efecto inhibitorio de la IL-10 es dosis-dependiente, con un efecto máximo con 100 ng/ml, -una concentración similar a aquella que induce el crecimiento de células B normales-. La IL-10 no inhibe la incorporación de timidina obtenida en respuesta a la interleucina 2 (Fluckiger y col., 1994). Otros hallazgos atribuyen a la IL-10 una acción positiva sobre la proliferación celular en la LLC-B, que se suprime mediante la inhibición de la síntesis de dicha citocina (Peng y col., 1995).

La IL-10 induce la síntesis de ADN en las células de la LLC-B activadas mediante el anticuerpo anti CD40, actuando la citocina de forma sinérgica con la IL-2, objetivándose un aumento en la expresión del CD25 en estas células leucémicas. Se ha hipotetizado que la acción de la IL-10 es la de permitir la respuesta de los linfocitos neoplásicos a la IL-2 a través de la inducción de los receptores de alta afinidad de la IL-2 en esas células (Fluckiger y col., 1993; Lagneaux y col., 1994).

La IL-10 aumenta la secreción de IgM en las células de la LLC-B, activadas mediante un anticuerpo anti-CD40, o bien coestimuladas con SAC y también de forma sinérgica con la IL-2 (Fluckiger y col., 1993; Fluckiger y col., 1994).

Acción de la IL-10 sobre la apoptosis

La inhibición de la síntesis de ADN inducida por la IL-10 se asocia a un descenso en la viabilidad celular, que sigue a una apoptosis de las células de la LLC-B (Fluckiger y col., 1994; Itoh e Hirohata, 1995).

La IL-10 inhibe la supervivencia y la síntesis de ADN de las células de LLC-B, mientras que aumenta la secreción de inmunoglobulinas. Estos hallazgos llevan a Fluckiger y col., 1994, a considerar a la IL-10 en la inmunoterapia de las LLC-B quimiorresistentes. Por el contrario, fruto de la disparidad de resultados sobre esta citocina, otros autores sugieren que la IL-10 puede ser un factor de crecimiento autocrino en la LLC-B (Peng y col., 1995; Rozman y Montserrat, 1995).

2.10. Factor de crecimiento transformador beta

Tanto las células T activadas por un estímulo antigénico, como los monocitos activados por polisacárido secretan el factor de crecimiento transformador beta (TGF β , del inglés "Transforming growth factor"). Sus acciones son altamente pleiotrópicas. El TGF β inhibe el crecimiento de numerosos tipos celulares y estimula el crecimiento de otros (Abbas y col., 1994). Los linfocitos B normales expresan el TGF β y la neutralización del TGF β endógeno da lugar a una respuesta proliferativa aumentada por parte de estas células (Lotz y col., 1994). El TGF β inhibe la síntesis de ADN inducida por la IL-2 en los linfocitos B normales (Banchereau y Rousset, 1992) y puede inducir la secreción de IgA (Abbas y col., 1994).

Expresión constitutiva del gen del TGF β

Los datos que existen hasta el momento son discordantes. Para unos autores, la expresión del TGF β está aumentada en las células de la LLC-B en relación a los linfocitos B normales (Lotz y col., 1994). Para otros, los linfocitos B de personas normales y de pacientes con LLC-B tienen niveles bajos o indetectables del ARNm del TGF β (Israels y col., 1993).

Acción del TGF β sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B

Los linfocitos B de la LLC-B son sensibles a esta citocina. El empleo de un anticuerpo neutralizante del TGF β (anti-TGF β) aumenta la proliferación de las células de la LLC-B, en ausencia de otro estímulo (Lagneaux y col., 1994; Lotz y col., 1994). Además, la adición del TGF β inhibe, de forma heterogénea, la proliferación celular espontánea (Moore y col., 1993; Lagneaux y col., 1994), la inducida por un éster del forbol, un anticuerpo anti- μ , la IL-2 o el mismo anti-TGF β (Lagneaux y col., 1994; Lotz y col., 1994). El TGF β inhibe la síntesis de ADN en los linfocitos normales y tumorales, pero en éstos en menor proporción; esta diferencia puede explicar la acumulación selectiva de los linfocitos B leucémicos en la LLC-B (Israels y col., 1993).

El TGF β reduce la proliferación de las células B de la LLC-B inducida por un anticuerpo anti-CD40, pero no la inhibe por completo (Lotz y col., 1994).

El TGF β no induce la diferenciación de las células de la LLC-B estimuladas con anti-IgM o anti-CD40 (Fluckiger y col., 1992).

Presencia del TGF β en el suero y producción del TGF β por las células de la LLC-B en cultivo

Se ha detectado un nivel elevado de TGF β en el plasma de pacientes con LLC-B (Lotz y col., 1994).

Los resultados son contradictorios en lo que se refiere a la capacidad de las células de la LLC-B de producir TGF β . Mientras para un grupo de trabajo los linfocitos B leucémicos secretan cantidades bajas de la citocina (Israels y col., 1993), para otro, las células del estroma de la médula ósea de pacientes con LLC-B producen más TGF β que las personas sanas (Lagneaux y col., 1992). Lotz y col., 1994, observan que los linfocitos B de la LLC-B secretan TGF β , tanto de forma espontánea, como tras su activación con anti-IgM y un éster del forbol. Moore y col., 1993, encuentran que las células leucémicas secretan un mayor porcentaje de TGF β bioactivo que los linfocitos B normales.

Acción del TGF β sobre la apoptosis en la LLC-B

El TGF β no protege de la apoptosis a las células de esta neoplasia hematológica (Dancescu y col., 1992; Tanghe y col., 1994).

El TGF β puede funcionar como un inhibidor del crecimiento autocrino, responsable en parte de la baja respuesta de proliferación de las células leucémicas y de la lenta progresión de esta enfermedad (Lotz y col., 1994).

2.11. Interferón alfa

La fuente principal de esta citocina es el monocito. El interferón alfa (IFN α) no induce la síntesis de ADN en los linfocitos B normales (Banchereau y Rousset, 1992).

Acción del IFN α sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B

El IFN α no tiene acción alguna (Van Kooten y col., 1992; Burke y col., 1993; Jewell y col., 1993), o induce una respuesta proliferativa heterogénea de los linfocitos B leucémicos en reposo (Östlund y col., 1986; Östlund y col., 1988; Luo y col., 1991; Panayiotidis y col., 1994_b), o bien activados con un anticuerpo anti-inmunoglobulina (Karray y col., 1988_b; Karray y col., 1988_c). Esta citocina aumenta la proliferación inducida por la IL-2 (Karray y col., 1988_c; Brizard y col., 1994), hallazgo no objetivado por Jewell y col., 1993. El IFN α aumenta la expresión del ARNm del antígeno de activación CD23 en los linfocitos B de la LLC-B (Fournier y col., 1992).

Heslop y col., 1990, sugieren que el IFN α puede realizar su efecto terapéutico en la LLC-B y en la LCP mediante la interrupción de la producción de factores de crecimiento autocrino. Así, observan la reducción del acúmulo del ARNm de una variedad de citocinas, incluyendo la IL-1 α y β , el TNF α y la IL-6. De igual forma, Bianchi y col., 1988, demuestran que el IFN α disminuye el acúmulo del ARNm del TNF α en las células B de la LLC-B, al tiempo que reduce la expresión de los

receptores del TNF α en esos mismos linfocitos. Jewell y col., 1992, objetivan que el IFN α no desarrolla su acción terapéutica a través del aumento de la actividad NK o LAK. La respuesta clínica al IFN α no guarda relación con los efectos que esta citocina realiza, de forma heterogénea, sobre la síntesis de ADN y transformación morfológica en las células de la LLC-B (Panayiotidis y col., 1990).

La asociación de IFN α con lipopolisacárido no induce de forma significativa la producción de IgM o de IgG por parte de los linfocitos B leucémicos (Poljak y col., 1993).

Expresión del receptor del IFN α en la membrana de los linfocitos de la LLC-B

Los linfocitos B de la LLC-B presentan en su membrana el receptor de esta citocina de forma heterogénea (Dadmarz y col., 1986; Östlund y col., 1989_b). La expresión del receptor se relaciona con el estadio de la LLC-B, de forma que los estadios más avanzados de la enfermedad se asocian con un número bajo de receptores, y la enfermedad temprana se caracteriza por la presencia de un número alto de los mismos (Dadmarz y Cawley, 1988). La expresión del receptor del IFN α se asocia con la presencia del antígeno CD23, lo que lleva a sugerir que estos linfocitos tumorales son células activadas (Dadmarz y Cawley, 1988)

Acción del IFN α sobre la apoptosis en la LLC-B

El IFN α aumenta, de forma dosis dependiente, la expresión de la proteína bcl-2 en las células de la LLC-B, y protege a éstas de la apoptosis que sufren de forma espontánea, o la inducida por hidrocortisona, o por radiación gamma (Jewell y col., 1993; Panayiotidis y col., 1993_b; Jewell y col., 1994_b; Panayiotidis y col., 1994_b). Estos hallazgos *in vitro* indican que la respuesta clínica que presentan algunos pacientes al IFN α no puede ser explicada por un efecto citotóxico directo de la citocina sobre las células de la LLC-B circulantes (Panayiotidis y col., 1994_b; Zinzani y col., 1994). El IFN α aumenta de igual forma la expresión de bcl-2 en las células malignas *in vivo* (Jewell y col., 1994_b). Chaouchi y col., 1993, objetivan que el IFN α inhibe la apoptosis de los linfocitos leucémicos sin aumentar la expresión de la proteína bcl-2.

El IFN α aumenta la expresión del antígeno Fas en la membrana de los linfocitos B de la LLC-B (Panayiotidis y col., 1994_a).

2.12. Interferón gamma

Las células que producen esta citocina son los linfocitos T y las células NK. El interferón gamma (IFN γ) no induce la síntesis de ADN en los linfocitos B normales (Banchereau y Rousset, 1992). El IFN γ estimula, entre otras acciones, al linfocito B para que produzca inmunoglobulinas (Abbas y col., 1994). El IFN γ inhibe el estímulo de la IL-4 sobre la expresión del CD23 en los linfocitos B (Banchereau y Rousset, 1992).

Expresión constitutiva del gen del IFN γ en la LLC-B

Se ha detectado la presencia del ARNm en los linfocitos B de la LLC-B sin activar (Buschle y col., 1993; Plate y col., 1993_b).

Acción del IFN γ sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B

El IFN γ estimula la síntesis de ADN en la mayoría de los pacientes con LLC-B, cuyos linfocitos B han sido activados a través de un anticuerpo anti-CD40 (Fluckiger y col., 1992). Sin embargo, cuando esos linfocitos son activados con SAC₁, o bien con anticuerpos anti-Ig, el IFN γ no induce la proliferación celular (Karray y col., 1988_c; Carlsson y col., 1989; Engel y col., 1989). En las células leucémicas sin activar, el IFN γ tampoco estimula el crecimiento (Karray y col., 1988_c; Östlund y col., 1989_a; Van Kooten y col., 1992; Burke y col., 1993; Buschle y col., 1993), aunque la respuesta a la citocina es heterogénea (Östlund y col., 1986; McManus y col., 1993). El IFN γ sí aumenta la proliferación inducida por la IL-2 (Karray y col., 1988_c; McManus y col., 1993; Brizard y col., 1994), aunque este hallazgo no es unánime (Carlsson y col., 1989).

El IFN γ induce la proliferación de los linfocitos T tumorales en la LLC-T (Alfinito y col., 1994).

El IFN γ aumenta la expresión del ARNm del antígeno de activación CD23 en los linfocitos B de la LLC-B, al contrario de lo que sucede en el linfocito B normal (Fournier y col., 1992). Esta citocina no inhibe la inducción de la expresión del CD23, que lleva a cabo la IL-4 y la IL-2 (Hivroz y col., 1989).

La acción del IFN γ sobre la diferenciación de la célula leucémica es controvertida. Mientras que unos autores atribuyen a la citocina una acción positiva en la inducción de la diferenciación del linfocito B de la LLC-B (Tremisi y Bich-Thuy, 1991), otros no encuentran ese efecto (Engel y col., 1989).

Expresión del receptor del IFN γ en la membrana de los linfocitos de la LLC-B

Se observa la presencia del receptor de esta citocina en la membrana de las células tumorales, aunque la densidad antigénica es baja (Buschle y col., 1993; Rojas y col., 1994). Después de cuatro días en cultivo con IFN γ , los linfocitos B de los pacientes de LLC-B con mal pronóstico -estadios III y IV de la clasificación de Rai- aumentan la expresión del receptor de la citocina en su membrana (Rojas y col., 1994).

Presencia del IFN γ en el suero de los pacientes y producción de la citocina por las células de la LLC-B en cultivo

Se detectan niveles séricos de IFN γ elevados en los pacientes con LLC-B y no en personas sanas (Buschle y col., 1993), aunque no es un hallazgo unánime (Rojas y col., 1994). El nivel de IFN γ está también elevado en el suero de los pacientes con LLC-T (Raziuddin y col., 1994).

Los linfocitos B de la LLC-B (Buschle y col., 1993), así como los T de la LLC-T (Alfinito y col., 1994), sintetizan IFN γ .

Acción del IFN γ sobre la apoptosis

Esta citocina inhibe la muerte celular programada, de forma dosis dependiente, y promueve la supervivencia de las células de la LLC-B en cultivo. El IFN γ , al retrasar la apoptosis, puede prolongar la vida media de las células tumorales y contribuir, por lo tanto, a su acumulación clonal (Buschle y col., 1993; Jewell y col., 1993; Kobayashi y col., 1993; Panayiotidis y col., 1993_b; Panayiotidis y col., 1994_b; Rojas y col., 1994). La inhibición de la apoptosis se asocia al pronóstico de la enfermedad, siendo el porcentaje de inhibición mayor en los pacientes con estadios avanzados de la LLC-B (Rojas y col., 1994).

El IFN γ induce la expresión del antígeno Fas (Panayiotidis y col., 1993_b; Panayiotidis y col., 1994_a).

2.13. Otras citocinas

2.13.a. Interleucina 5

La acción principal de la interleucina 5 (IL-5) es la de estimular el crecimiento y diferenciación de los eosinófilos y la de activar a los eosinófilos maduros, de forma que puedan eliminar a los helmintos (Abbas y col., 1994). Los linfocitos B normales expresan el receptor de la IL-5 (Baumann y col., 1992), citocina que es capaz de aumentar la secreción de IgM de dichas células activadas con SAC. Esta acción la realiza sinérgicamente con la IL-2 y la IL-4 (Kishimoto y Hirano, 1988; Bertolini y col., 1993). También es un factor de crecimiento para las células B previamente activadas (Kishimoto y Hirano, 1988). El receptor de membrana de la IL-5 pertenece a una familia de receptores de citocinas, formado además por la IL-3 y el factor estimulador de colonias granulocíticas y macrofágicas (Kishimoto y col., 1995).

Expresión constitutiva del gen de la IL-5

Las células de la LLC-B no expresan de forma constitutiva el gen de la IL-5 (Plate y col., 1993_b; Di Celle y col., 1994).

Acción de la IL-5 sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B

La IL-5 no induce la proliferación ni la diferenciación de las células de la LLC-B (Carlsson y col., 1989; Digel y col., 1991; Fluckiger y col., 1992; Mainou-Fowler y col., 1992; Hayes y col., 1993). Esta citocina no aumenta la expresión del antígeno CD23 en esas células (Fournier y col., 1992).

Expresión del receptor de la IL-5 en la membrana de los linfocitos de la LLC-B

Los receptores de esta citocina están presentes en los linfocitos de una línea celular murina de LLC-B (Mita y col., 1988). No se ha investigado la forma de unión de la IL-5 a los linfocitos B de la LLC-B humana.

Acción de la IL-5 sobre la apoptosis en la LLC-B

Se ha observado que la IL-5 induce la apoptosis (Mainou-Fowler y col., 1992; Mainou-Fowler y col., 1994), o no protege de ésta (Dancescu y col., 1992), a los linfocitos B de la LLC-B por un mecanismo independiente de la expresión de la proteína bcl-2.

2.13.b. Interleucina 6

Se expone con detalle en un capítulo dedicado a esta citocina, dada su importancia en este estudio.

2.13.c. Interleucina 9

La interleucina 9 (IL-9) es un regulador de la eritropoyesis y un factor estimulador del crecimiento de los linfocitos T activados humanos (Renauld y col., 1993). No tiene una acción conocida sobre los linfocitos B humanos (Abbas y col., 1994). La IL-9 comparte con otras interleucinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15) la cadena γ de su receptor de membrana, de ahí la redundancia de funciones de las citocinas como factores de crecimiento de las células T (Kishimoto y col., 1995).

Se ha observado que la IL-9 es un factor autocrino para el crecimiento *in vitro* de una línea celular de linfoma de Hodgkin (Renauld y col., 1993). No hay estudios que demuestren que esta citocina esté implicada en la fisiopatología de la LLC-B.

2.13.d. Interleucina 11

La interleucina 11 (IL-11) es una citocina derivada de los fibroblastos de la médula ósea, con una gran variedad de actividades. Entre ellas están: el mantenimiento de ciertas líneas de plasmacitoma e hibridoma y la sinergia con la IL-3 en la formación de colonias de megacariocitos, junto con el acortamiento de la fase G_0 del ciclo celular de los progenitores no comprometidos de la médula ósea. Su acción se confunde en numerosas ocasiones con las realizadas por la IL-6 (Yang y Yin, 1992; Gearing, 1993), citocina con la que comparte la molécula gp130 como transductora de señal (Kishimoto y col., 1995).

No hay estudios que relacionen a la IL-11 con la LLC-B.

2.13.e. Interleucina 12

Se la denominó inicialmente factor estimulador de la célula NK y factor de maduración del linfocito citotóxico. Entre sus funciones está la de aumentar la actividad citotóxica de las células T y NK y la de regular la producción de $IFN\gamma$. La fuente fundamental de la interleucina 12 (IL-12) son los monocitos, aunque también la producen los linfocitos B. Sobre el linfocito B, inhibe la síntesis de IgE inducida por la IL-4 (Trinchieri y Scott, 1994). El receptor de membrana de la IL-12 pertenece a la familia del receptor de citocinas gp130 (Kishimoto y col., 1995).

No hay estudios que conecten a la IL-12 con la LLC-B.

2.13.f. Interleucina 13

La interleucina 13 (IL-13) es una citocina producida por el linfocito T activado y que comparte homología con la IL-4 (Minty y col., 1993). La IL-13 realiza sobre las células B normales gran número de las acciones desarrolladas por la IL-4. Así, induce una proliferación intensa y prolongada de los linfocitos B estimulados a través del sistema del CD40 o por anticuerpos anti-IgM; estimula la secreción de IgG₄ e IgE, e induce la expresión del antígeno CD23 en las células B en reposo

(Briere y col., 1993; McKenzie y col., 1993; Punnonen y col., 1993; Banchereau y col., 1994; Defrance y col., 1994; Punnonen y de Vries, 1994). Por otra parte, la IL-13 estimula la proliferación de las células T e inhibe la producción de las citocinas inflamatorias liberadas por los monocitos (Quesenberry, 1995).

Acción de la IL-13 sobre la proliferación celular en la LLC-B

La IL-13 induce la síntesis de ADN en los linfocitos B de la LLC-B activados mediante un anticuerpo anti-CD40, aumenta la recuperación de células viables en el cultivo, e incrementa la expresión del antígeno CD23. La acción sobre la proliferación celular la realiza de forma dosis dependiente y sinérgicamente con la IL-10 (Fluckiger y col., 1994). Estas acciones son similares a las realizadas por la IL-4 en las mismas condiciones de cultivo celular.

A diferencia de la acción de la IL-4, la IL-13 no inhibe la proliferación, inducida por la IL-2, de los linfocitos B de la LLC-B activados mediante un anticuerpo anti-IgM. La IL-13 tampoco aumenta la expresión del antígeno CD23 en los linfocitos B de la LLC-B en reposo, o bien activados a través de un anticuerpo anti-IgM (Fluckiger y col., 1994).

Acción de la IL-13 sobre la apoptosis

La IL-13 no impide la entrada en apoptosis de las células B de la LLC-B activadas a través de un anticuerpo anti-IgM (Fluckiger y col., 1994), al contrario de la acción realizada por la IL-4.

2.13.g. Interleucina 14

La interleucina 14 (IL-14) fue denominada en un principio factor de crecimiento de células B de alto peso molecular (HMW-BCGF, del inglés "high molecular weight - B cell growth factor").

Se ha sugerido que la producción autocrina o paracrina de IL-14 puede jugar un papel relevante en la rápida proliferación de los linfomas agresivos no Hodgkin de células B (Ford y col., 1995), pero no hay estudios que atribuyan a la IL-14 una acción en el desarrollo de la LLC-B.

2.13.h. Interleucina 15

La producción de interleucina 15 (IL-15) se ha detectado en una gran variedad de células. Desde un punto de vista inmunológico, la fuente más importante de producción de la citocina son los monocitos activados. La IL-15 comparte muchas propiedades biológicas con la IL-2. La IL-15 activa las células NK humanas a través de componentes del receptor de la IL-2 (Arza y col., 1994; Carson y col., 1994). La IL-15 realiza sobre los linfocitos B una acción similar a la llevada a cabo por la IL-2 sobre esa línea celular. Así, la IL-15 coestimula la proliferación de los linfocitos B activados con anti-IgM humana o con un éster del forbol, pero no tiene ningún efecto estimulador sobre las células B en reposo. La IL-15 es un inductor potente de la secreción de IgM, IgG₁ e IgA, en combinación con un anticuerpo anti-CD40 (Armitage y col., 1995).

No hay estudios que impliquen a la IL-15 en la fisiopatología de la LLC-B.

2.13.i. Interleucina 16

La interleucina 16 (IL-16), denominada previamente factor quimotáctico de linfocitos, es una linfocina secretada por los linfocitos T CD8 (+) activados, que actúa selectivamente sobre las células CD4 (+) a través de su receptor CD4. Este factor soluble ha sido implicado en la inhibición de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (Baier y col., 1995; Fauci, 1995; Laberge y col., 1995).

No hay estudios que atribuyan un papel a la IL-16 en la génesis de la LLC-B.

2.13.j. Factor inhibidor de leucemias. Factor neurotrófico ciliar. Oncostatina M. Cardiotropina 1

Factor inhibidor de leucemias

El factor inhibidor de leucemias no tiene una acción conocida sobre la función de los linfocitos de personas sanas. Se describe inicialmente como un factor

inhibidor de una línea de melanoma humano (Akira y col., 1993). Interviene en la diferenciación de la célula leucémica mieloide y tiene una acción sinérgica con la IL-3 en el estímulo de las células progenitoras hematopoyéticas (Gearing, 1993). Estimula la proliferación de los progenitores de los megacariocitos. Sus acciones son, en muchos casos, similares a las de la IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotropina 1 y el factor neurotrófico ciliar. Estas seis citocinas comparten la glicoproteína gp130 del receptor de membrana, que constituye el transductor de la señal de dichas moléculas (Fourcin y col., 1994; Zhang y col., 1994; Kishimoto y col., 1995).

Factor neurotrófico ciliar

El factor neurotrófico ciliar promueve la supervivencia de las neuronas ciliares y afecta a la diferenciación glial. No tiene una acción determinada sobre los linfocitos de personas sanas (Gearing, 1993). Comparte acciones con la IL-6 (Akira y col., 1993; Kishimoto y col., 1995).

Oncostatina M

La Oncostatina M es producida por los linfocitos T y monocitos activados. Entre las acciones desarrolladas esta citocina se encuentra la de intervenir en la diferenciación de la célula leucémica mieloide (Gearing, 1993). Comparte acciones con la IL-6, entre las que destaca la inducción de proteínas de fase aguda en el hígado (Akira y col., 1993; Kishimoto y col., 1995). La Oncostatina M puede intervenir en la regulación de la mielopoyesis, al inducir la expresión celular de los factores de crecimiento hematopoyéticos (Brown y col., 1993).

Cardiotropina 1

La cardiotropina 1 es una citocina que induce la hipertrofia del miocito cardíaco (Kishimoto y col., 1995). Al igual que el resto de las citocinas englobadas en este apartado, comparte la glicoproteína gp130 del receptor de membrana.

Ninguna de estas cuatro citocinas tiene un efecto demostrado sobre la fisiopatología de la LLC-B.

2.13.k. Factor estimulador de colonias granulocíticas y macrofágicas. Factor estimulador de colonias granulocíticas. Factor estimulador de colonias macrofágicas

Las citocinas que estimulan la expansión y diferenciación de las células progenitoras de la médula ósea se denominan en conjunto factores estimuladores de colonias (CSF, del inglés "Colony-stimulating Factors").

GM-CSF

El factor estimulador de colonias granulocíticas y macrofágicas (GM-CSF) regula la proliferación y diferenciación de las células progenitoras de los neutrófilos, eosinófilos y monocitos. No tiene acción sobre los linfocitos (Nicola, 1987). Su acción sobre las células hemopoyéticas coincide parcialmente con la desarrollada por la IL-3, con la que comparte un transductor de señal común (Kishimoto y col., 1995).

No se ha encontrado la expresión constitutiva del gen del GM-CSF en las células de la LLC-B (Di Celle y col., 1994).

Esta citocina no induce la proliferación ni la diferenciación de las células de la LLC-B (Fluckiger y col., 1992; Till y col., 1995). Por el contrario, Trentin y col., 1994, objetivan que este factor de crecimiento realiza una pequeña acción proliferativa sobre los linfocitos B de la LLC-B. El GM-CSF aumenta la proliferación inducida por la IL-2 y por el TNF α (Trentin y col., 1994).

Los linfocitos B de la LLC-B presentan en su membrana los receptores del GM-CSF, cuya expresión aumenta en contacto con la IL-2 (Trentin y col., 1994). Sin embargo, este hallazgo no es unánime (Till y col., 1995).

Los linfocitos B de personas sanas -estimulados-, y de pacientes con LLC-B, bien en reposo (Zupo y col., 1992) o tras activación con SAC₁ (Pistoia y col., 1993), secretan GM-CSF.

G-CSF

El factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) regula la proliferación y diferenciación de las células progenitoras de los neutrófilos y no tiene acción

sobre los linfocitos (Nicola, 1987). El receptor de membrana del G-CSF pertenece a la familia del receptor de citocinas gp130 (Kishimoto y col., 1995).

Los linfocitos B de la LLC-B presentan en su membrana los receptores del G-CSF, cuya expresión aumenta en contacto con la IL-2 (Trentin y col., 1994). Los linfocitos B activados de personas sanas y de pacientes con LLC-B secretan G-CSF (Corcione y col., 1992; Pistoia y col., 1993). El G-CSF no estimula la proliferación de las células B de la LLC-B (Trentin y col., 1994).

M-CSF

El factor estimulador de colonias macrofágicas (M-CSF) regula la proliferación y diferenciación de las células progenitoras de los monocitos de la médula ósea a monocitos y macrófagos maduros, y no tiene acción sobre los linfocitos (Nicola, 1987). El receptor del M-CSF se expresa predominantemente en macrófagos, monocitos y sus precursores de la médula ósea (Aracil, 1994).

Los niveles séricos de M-CSF, disminuidos en los pacientes con LLC-B en estadio temprano de la enfermedad, aumentan si existe respuesta al tratamiento con IFN α (Jewell y col., 1994_a).

2.13.1. Factor de células "stem"

También se denomina factor de crecimiento de mastocitos, producto del locus "steel" y ligando del receptor c-kit. Interviene en la proliferación de los precursores de las células B normales (Saeland y col., 1992). El protooncogen c-kit es el receptor de la citocina y se expresa en la mayoría de los precursores hematopoyéticos (Aracil, 1994).

El factor de células "stem" tiene un efecto estimulador sobre los linfocitos B de la LLC-B, si bien de forma heterogénea (Kleine y col., 1992).

2.13.m. Eritropoyetina

La eritropoyetina es producida fundamentalmente por las células intersticiales peritubulares renales. Los receptores de esta citocina se encuentran en los eritroblastos. La célula diana más importante de la eritropoyetina son las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E, del inglés "Colony-forming unit-erythroid"). Una de las acciones de la citocina es la de disminuir el porcentaje de progenitores eritroides que entran en apoptosis, permitiendo su maduración final (Quesenberry, 1995).

Los progenitores eritroides de la LLC-B son sensibles a la eritropoyetina humana recombinante *in vitro* y se ha sugerido que esta citocina puede ser útil en algunos pacientes, independientemente de la infiltración linfocitaria en la médula ósea (Tsatalas y col., 1994).

2.13.n. Trombopoyetina

La trombopoyetina, también denominada ligando del receptor c-mpl, está implicada en el estímulo de la producción y maduración de los megacariocitos (Schick, 1994; Kaushausky, 1995). La IL-11, el factor de células "stem" y la eritropoyetina actúan sinérgicamente con la trombopoyetina en el estímulo de la proliferación de las unidades formadoras de colonias de megacariocitos (Broudy y col., 1995).

No existen estudios que relacionen a la trombopoyetina con la LLC-B.

2.13.ñ. Factor de necrosis tumoral beta o linfoxina

El factor de necrosis tumoral beta (TNF β) induce la síntesis de ADN en los linfocitos B normales, estimulados con anti-IgM o SAC (Banchereau y Rousset, 1992). Compite con el TNF α en la unión al receptor de membrana.

No se ha encontrado la expresión constitutiva del gen de esta citocina en las células B de la LLC-B (Trentin y col., 1993).

El TNF β no induce la señal de proliferación en los linfocitos B de la LLC-B (Trentin y col., 1993), salvo de forma heterogénea (Digel y col., 1991) y sólo tras ser activados con SAC₁ (Álvarez-Mon y col., 1993). Por el contrario, Mobergs y col., 1989, encuentran que el TNF β puede actuar como factor de crecimiento de las células B de la LLC-B, en un estudio realizado con sólo seis pacientes. El TNF β no aumenta la expresión del antígeno CD23 en las células B de la LLC-B (Fournier y col., 1992).

El TNF β no protege de la muerte celular programada a los linfocitos B de la LLC-B (Sarfati, 1993).

2.13.o. Interferón beta

El Interferón beta (IFN β) constituye el segundo grupo serológico del IFN tipo I. El IFN β , a pesar de su escasa similitud estructural con el IFN α , se une al mismo tipo de receptor celular que esta otra citocina. Ambos interferones participan en la inhibición de la replicación viral y en la supresión de la proliferación celular (Abbas y col., 1994).

El IFN β induce la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B de forma heterogénea y sin diferencia evidente con el IFN α o el IFN γ (Östlund y col., 1986; Östlund y col., 1989a).

El IFN β aumenta la expresión de la proteína bcl-2 en las células de la LLC-B, y protege a éstas de la apoptosis que sufren de forma espontánea (Panayiotidis y col., 1993b).

2.13.p. Factor de crecimiento básico de los fibroblastos

El factor de crecimiento básico de los fibroblastos (bFGF, del inglés, "basic fibroblast growth factor") es un factor de crecimiento pleiotrópico, que actúa junto con el factor de células "stem" sobre las células progenitoras multipotentes tempranas y sobre los progenitores de los megacariocitos. Además de su acción sobre la hematopoyesis, tiene un efecto sobre la angiogénesis y sobre el desarrollo del mesodermo (Quesenberry, 1995).

Los niveles intracelulares de bFGF en los linfocitos B de la LLC-B están elevados en los pacientes con estadios avanzados de la enfermedad, en comparación con aquellos enfermos en estadios intermedios e iniciales, y en relación también con las personas sanas. El nivel intracelular elevado de bFGF protege de la muerte celular programada a estas células leucémicas (Menzel y col., 1994). De igual forma, el nivel plasmático de la citocina se encuentra alto en esos mismos estadios de la LLC-B (Duensing y Atzpodien, 1995).

2.13.q. Otras citocinas

Citocinas con acción estimuladora

Entre las citocinas con actividad estimuladora sobre las líneas linfohemopoyéticas se encuentran, junto al bFGF ya comentado, las siguientes:

- el factor de crecimiento derivado de las plaquetas: su acción se realiza en los progenitores granulopoyéticos y eritroides. Además, induce la producción del TNF α en los linfocitos B, lo que sugiere que ese factor plaquetario está implicado en la regulación de la secreción de citocinas de la línea celular B (Smith y col., 1994).

- el factor de crecimiento de los hepatocitos: tiene una acción sinérgica con otros factores sobre las células progenitoras.

- los factores de crecimiento "insulin-like" I y II: estimulan el crecimiento y diferenciación de los progenitores mieloides y eritroides. Las proteínas de unión a estos factores se denominan con los números 1 a 6.

- factor promotor de actividad "burst" unido a la membrana: estimula la formación de "burst" (o eclosiones) eritroides: BFU-E o unidades formadoras de colonias eritroides ("burst").

No existen estudios que impliquen a estas citocinas en la fisiopatología de la LLC-B.

Citocinas con acción inhibidora

Además del TGF β , el IFN α , el IFN β , el IFN γ , el TNF α y el TNF β , se han descrito otras citocinas con efectos inhibitorios sobre la linfopoyesis. Entre ellas están: la

subunidad H de la ferritina, la prostaglandina E₁ y E₂, la inhibina, la lactoferrina y la familia de las quemoquinas.

Dentro de las quemoquinas α se han incluido: la proteína inflamatoria de los macrófagos 2 α (MIP-2 α , del inglés "macrophage-inflammatory protein-1-alpha"), la MIP-2 β , el factor plaquetario 4, la IL-8, el péptido activador de los neutrófilos 2, la proteína 10 inducible por interferón, la quemoquina Mig y el Gro- α . En la clasificación de las quemoquinas β se encuentran: la MIP-1 α , la MIP-1 β , el factor activador y quemoquino del macrófago (MCP-1) y el Rantes (del inglés "Regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted") (Liao y col., 1995; Quesenberry, 1995). Estas moléculas tienden a inhibir los progenitores más primitivos y pueden estimular el crecimiento de las células progenitoras más maduras.

Tampoco existen trabajos que demuestren que estas citocinas están involucradas en el desarrollo de la LLC-B.

3. INTERLEUCINA 6

3.1. Introducción

La interleucina 6 tiene dos propiedades características de las citocinas: el pleiotropismo funcional y la redundancia. Fue aislada por diferentes grupos de investigadores pensando que eran productos distintos, y recibió de ellos denominaciones diversas según las funciones que desarrollaba. Entre finales de 1986 y principios de 1987 se llegó a la conclusión de que todos esos factores, en apariencia no relacionados, no eran sino una misma proteína, que había recibido distintos nombres, reflejando cada uno de ellos una característica diferente de la misma. A partir de entonces se conoce como interleucina 6 (IL-6). Algunas de sus denominaciones han sido: factor estimulante 2 de las células B, factor de diferenciación de células B (Okada y col., 1983; Hirano y col., 1984; Hirano y col., 1985; Hirano y col., 1986), proteína de 26 kilodalton (Haegeman y col., 1986), factor sustitutivo de células T (o TRF, del inglés: "T-cell replacing factor") (Muraguchi y col., 1981; Teranishi y col., 1982), interferón beta 2 (Weisseinbach y col., 1980; Zilberstein y col., 1986), factor de crecimiento de plasmocitomas, factor de crecimiento de plasmocitoma-hibridomas humanos (Aarden y col., 1985; Nordan y Potter, 1986; Van Damme y col., 1987; Van Snick y col., 1988), factor estimulante de los hepatocitos (Gauldie y col., 1987), y factor de diferenciación de células T citotóxicas (Takai y col., 1988).

3.2. La proteína y el gen de la interleucina 6

La interleucina 6 humana es una glicoproteína de cadena única, con un peso molecular que oscila entre 21 y 28 kilodalton, según el grado de glicosilación. Presenta una homología significativa con el factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF, del inglés: "Granulocyte-Colony Stimulating Factor"), y de la

misma manera que sus receptores, tiene un alto nivel de identidad en sus secuencias.

El gen que codifica la IL-6 humana se encuentra en el cromosoma 7 (7p21), y ha sido ya secuenciado. Tiene cinco exones y cuatro intrones. El ADN genómico que codifica el G-CSF muestra estructura similar al de la IL-6, como ocurría a nivel proteico.

La IL-6 humana y la IL-6 murina presentan una homología del 65% en el ADN, que desciende al 42% a nivel proteico. La IL-6 humana es activa en el ratón (Van Snick, 1990).

3.3. Origen celular y regulación de la producción de interleucina 6

La producción de IL-6 se ha detectado en una gran variedad de células: fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, monocitos/macrófagos, células T, mastocitos, diferentes líneas tumorales y otras. Desde un punto de vista inmunológico, la fuente más importante de producción de IL-6 son las células accesorias (Kishimoto, 1989; Van Snick, 1990; Hirano, 1992; Kishimoto y col., 1992; Cavaillon, 1993).

La producción de IL-6 se da en respuesta a infecciones virales, y es asimismo inducida por lipopolisacárido. Además, varias citocinas inducen la producción de IL-6 como son: la interleucina 1, el factor de necrosis tumoral -sólo o en asociación con el interferón gamma-, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, la interleucina 3, y el factor estimulador de colonias granulocíticas y macrofágicas (GM-CSF, del inglés: "Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor"). Sin embargo, no todas las células responden de forma similar a estos factores (Van Snick, 1990).

3.4. Regulación del receptor de la interleucina 6

La interleucina 6 realiza su acción a través de un receptor de membrana compuesto por una proteína de unión (glicoproteína (gp) 80) y un polipéptido encargado de la transducción de la señal (gp 130). Ambas moléculas son miembros

de la familia de receptores de citocinas, que incluye los receptores de: la interleucina 2 -en su cadena beta y gamma-, la interleucina 3, la interleucina 4, la interleucina 5, la interleucina 7, la interleucina 9, la interleucina 11, la eritropoyetina, el G-CSF, el GM-CSF, el factor inhibidor de leucemias, el factor neurotrófico ciliar, la oncostatina M, la cardiotropina 1, la hormona de crecimiento, y la prolactina (Hirano, 1992; Akira y col., 1993; Gearing, 1993; Kishimoto y col., 1995).

Las dos proteínas (gp 80 y gp 130) que configuran el receptor de la interleucina 6 (R-IL6) son funcionalmente diferentes. Cuando el receptor está ocupado por la interleucina 6 esas dos cadenas proteicas se unen extracelularmente, y forman lugares de unión de alta afinidad para esta citocina.

Debido al pleiotropismo de la interleucina 6, se pueden encontrar receptores de esta interleucina en varias líneas celulares. Se han detectado un alto número de receptores de la interleucina 6 en células de mieloma, cuya expresión aumentaba tras realizar un tratamiento con dexametasona. Dentro de la variedad celular donde se ha encontrado el receptor de la interleucina 6, hay que mencionar a los macrófagos y a los linfocitos B y T (Yamasaki y col., 1988; Snyers y col., 1989; Taga y col., 1989; Hirata y col., 1989; Bauer y col., 1989; Snyers y col., 1990; Hibi y col., 1990; Yasukawa y col., 1990; Taga y Kishimoto, 1992_a; Taga y col., 1992_b; Saito y col., 1992; Wognum y col., 1993).

La expresión del receptor de la interleucina 6 en diferentes líneas celulares se ha estudiado mediante el anticuerpo MT 18, que no compite con la interleucina 6 en la unión con su receptor; en linfocitos B no estimulados, no se detecta la presencia de dicho anticuerpo en los estudios de citometría de flujo. Sin embargo, las células B de amígdala con fenotipo μ^+/δ^- , estimuladas con "pokeweed mitogen" (PWM) durante 2 a 3 días, expresaban dicho anticuerpo en su superficie y no ocurría así en las de fenotipo μ^+/δ^+ . También se ha observado la unión de la IL-6, marcada con Iodo radiactivo (^{125}I -IL6), a células B de amígdala estimuladas mediante la cepa Cowan del *Staphylococcus aureus* (SAC), pero no en aquellas no expuestas al SAC. Asimismo se ha detectado el receptor de la interleucina 6 en linfocitos B normales activados *in vivo*. De ahí la conclusión de que el receptor de la interleucina 6 no se expresa en linfocitos B no activados, y sí en linfocitos B activados sin IgD de superficie. Esto es consistente con la observación de que las células B IgD(-) pertenecen al estadio final de maduración antes de convertirse en células productoras de inmunoglobulinas. Por el contrario, el receptor de la interleucina 6 se ha observado en células T periféricas no activadas. Mediante estudios de citometría de flujo, las células CD4+/CD8- y CD4-/CD8+ muestran expresión débil, pero significativa, del R-IL6, que no cambia tras ser estimuladas con fitohemaglutinina (PHA, del inglés: "Phytohemmagglutinin").

La diferente expresión del R-IL6 por linfocitos B y T activados y no activados refleja la diferencia funcional de esta citocina en ambas líneas celulares: la interleucina 6 actúa como un factor de diferenciación sobre los linfocitos B al final de su estadio de maduración, y sobre los linfocitos T como factor de activación, en un estadio precoz (Taga y col., 1987; Wognum y col., 1993).

3.5. Actividades biológicas de la interleucina 6

Se han atribuido a la IL-6 las siguientes acciones (Van Snick, 1990; Hirano, 1992) (Figura 1):

Diferenciación de la célula B

La interleucina 6 induce la producción de inmunoglobulinas en células estimuladas con SAC₁, pero no en linfocitos B no activados previamente. La producción de inmunoglobulinas se inhibe completamente con un anticuerpo anti-IL-6 (Freeman y col., 1989; Akira y col., 1993). No induce la proliferación de las células B. Es importante la sinergia con la interleucina 1 en su acción sobre la diferenciación del linfocito B.

Activación de la célula T

La interleucina 6 es un factor esencial, que actúa sinérgicamente con la interleucina 1 en el control de las etapas iniciales de la activación del linfocito T. En apoyo a la acción de la interleucina 6 en un estado temprano de la activación del linfocito T, está el hecho de que un anticuerpo frente a la interleucina 6 bloquea la proliferación celular inducida por esta citocina, sólo cuando se añade al comienzo de la respuesta, y el que la expresión del receptor de la interleucina 6 es inhibida tras la activación del linfocito T. La interleucina 6 induce la secreción de interleucina 2, y la expresión del receptor de esta citocina en los linfocitos T (Kishimoto y Hirano, 1988; Muraguchi y col., 1988). La IL-6 no sólo induce la proliferación, sino también la diferenciación del linfocito T citotóxico y aumenta la actividad de las células NK (Akira y col., 1993).

Hibridoma de células B y crecimiento del plasmocitoma

El crecimiento *in vitro* de los hibridomas de células B y del plasmocitoma de ratón aumenta en presencia de interleucina 6. Algunos de los resultados obtenidos para los plasmocitomas de ratón se han extendido también al caso de los mielomas humanos. La proliferación *in vitro* de ciertos mielomas humanos aumentaba en presencia de interleucina 6, y se inhibía con anticuerpos anti-interleucina 6. Además se observaba un aumento llamativo en los niveles de interleucina 6 en la médula ósea de pacientes con mieloma múltiple agresivo, y los niveles séricos de interleucina 6 mostraban una correlación con la actividad de la enfermedad, medida por la proporción de células de mieloma en la fase de síntesis del ciclo celular (Kawano y col., 1988; Klein y col., 1989; Bataille y col., 1989).

Inducción de la respuesta de la fase aguda

La interleucina 6 actúa sobre las células hepáticas como factor estimulante de los hepatocitos, e induce la formación de varias proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva, fibrinógeno β_2 , haptoglobina y hemopexina. Además, induce la aparición de fiebre y la liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH). Como ya se ha dicho, los glucocorticoides aumentan la expresión del receptor de la interleucina 6 (Gauldie y col., 1987; Kopf y col., 1994).

Hematopoyesis

La interleucina 6 tiene varias acciones sobre la hematopoyesis. Hace que los progenitores hematopoyéticos pasen de la fase G_0 del ciclo celular a la fase G_1 , en la cual pueden responder a otros factores de crecimiento, como la interleucina 3. Por lo tanto, la interleucina 6 y la interleucina 3 muestran efectos sinérgicos sobre la formación de colonias *in vitro*. La interleucina 6 actúa de forma sinérgica con el GM-CSF y con el M-CSF. También se ha observado que la interleucina 6 induce la maduración de los megacariocitos, y produce aumento en el número de plaquetas (Ikebuchi y col., 1987; Ishibashi y col., 1989; Ishibashi y col., 1989; Hoffman, 1989; Akira y col., 1993).

Miscelánea

Existe una miscelánea de acciones atribuida a la interleucina 6: la inducción del crecimiento de las células del mesangio y de los queratinocitos; la diferenciación y proliferación de las células neurales; la regulación de la remodelación del hueso, etc (Hirano, 1992; Akira y col., 1993).

3.6. Alteración en la regulación de la expresión de la interleucina 6 y su relación con procesos patológicos

Mieloma múltiple

Kawano y col., 1988, demuestran que las células de mieloma múltiple humano producen interleucina 6 y expresan en su membrana el receptor de dicha citocina. Además, ciertas líneas de mieloma -12 de los 26 pacientes incluidos en su serie- proliferan *in vitro* en respuesta a la interleucina 6 exógena, crecimiento que se inhibe al añadir al medio un anticuerpo frente a la interleucina 6. Todos estos datos, de forma conjunta, indican que la interleucina 6 puede actuar en el mieloma como un factor de crecimiento autocrino. Estos resultados se confirman en otros trabajos (Zhang y col., 1989), que hacen hincapié en la heterogeneidad de la respuesta de las líneas de mieloma a la IL-6 (Hitzler y col., 1991). Puesto que todas las células de mieloma parecen expresar el receptor de la IL-6, no queda claro por qué hay líneas de mieloma que no responden a la citocina. Una explicación posible es que los receptores de la IL-6 estén ocupados por la citocina elaborada de forma autocrina y no estén disponibles para la IL-6 exógena. La falta de respuesta parece desarrollarse en los estadios clínicos avanzados de la enfermedad.

Posteriormente, existen estudios que demuestran que la inyección de un anticuerpo monoclonal anti-interleucina 6 a varios pacientes con mieloma múltiple en fase terminal bloquea por completo la proliferación de células de mieloma *in vivo* (Klein y col., 1990; Klein y col., 1991). Además, se evidencia que anticuerpos frente al receptor de la interleucina 6 humana inhiben el crecimiento del mieloma *in vivo* (Suzuki y col., 1992). La importancia de la interleucina 6 en el mieloma múltiple viene dada también por el hecho de encontrar niveles séricos elevados de esta citocina en la enfermedad avanzada (Bataille y col., 1989; DuVillard y col., 1995). Por último, el receptor soluble de la IL-6 (Rs-IL6) se encuentra elevado en

pacientes con mieloma. La molécula del Rs-IL6 puede actuar como agonista del crecimiento celular en el mieloma y los niveles más elevados de este receptor se han asociado a una supervivencia menor (Kyle, 1994).

Recientemente, Ballester y col., 1994, llegan a conclusiones diferentes a las hasta entonces aceptadas. Observan una asociación entre niveles elevados de secreción de interleucina 6 por parte de las células de mieloma y una carga tumoral baja, además de una fracción de proliferación baja. Proponen, partiendo de sus hallazgos, que la IL-6 sea considerada como una citocina que induce la diferenciación de la célula de esta neoplasia, acción idéntica a la desarrollada en el linfocito B normal. Por estas razones, estos autores no encuentran sentido a los programas clínicos emprendidos con el fin de neutralizar la acción de la IL-6.

Hipergammaglobulinemia

La producción excesiva de interleucina 6 puede inducir una activación policlonal de células B, dando lugar a hipergammaglobulinemia y a producción de autoanticuerpos (Hirano, 1992; Hirano, 1992_b). Ejemplos de estas situaciones serían el mixoma cardíaco (Hirano y col., 1986; Hirano y col., 1987) y la enfermedad de Castleman (Yoshizaki y col., 1989; Leger-Ravet y col., 1991; Burger y col., 1994). En ambos casos, el tejido hiperplásico produce interleucina 6, y cuando se remueve el tejido tumoral se normaliza rápidamente el nivel de inmunoglobulinas.

Se ha atribuido igualmente un papel a la IL-6 en la hipergammaglobulinemia, que se observa en el lupus eritematoso sistémico (Kitani y col., 1992). En esta enfermedad autoinmune, se objetiva secreción espontánea de interleucina 6 junto con la expresión constitutiva del receptor de esa citocina en los linfocitos B, sugiriendo una activación autocrina de los linfocitos B de estos pacientes por la IL-6. Además, la introducción de un anticuerpo frente al R-IL6 en el cultivo de células B de esos pacientes, va seguido de una inhibición potente de la producción espontánea de inmunoglobulina policlonal y de los autoanticuerpos anti-ADN (Nagafuchi y col., 1993).

Otras observaciones sugieren que la expresión anormal de interleucina 6 puede contribuir a la enfermedad autoinmune generalizada, como ocurriría en la artritis reumatoide; se han detectado niveles altos de interleucina 6 en líquido sinovial de articulaciones de pacientes con artritis reumatoide (Hirano y col., 1988), y se ha demostrado la producción de esa citocina en la membrana sinovial de estos enfermos (Wood y col., 1992).

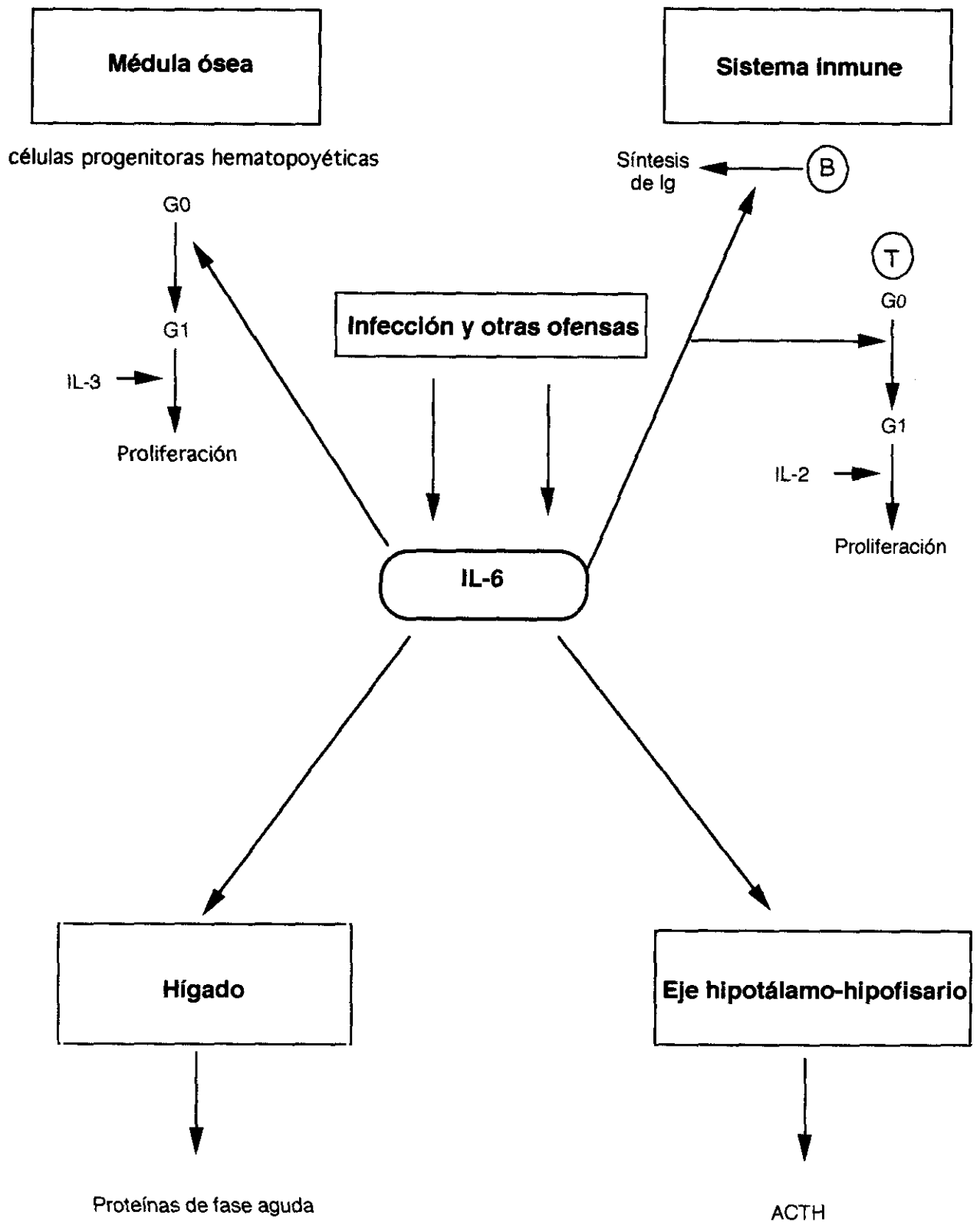


FIGURA 1. Acciones de la Interleucina 6

Glomerulonefritis mesangial

Se ha sugerido que la interleucina 6 interviene en el desarrollo de esta entidad, del mismo modo que se la ha implicado en la inducción del crecimiento de las células del mesangio (Hirano, 1992). La interleucina 6 es detectada en las muestras de orina de pacientes con esa patología renal y no en pacientes con otros grupos histológicos de glomerulonefritis; además, se observa una correlación entre los niveles de IL-6 en la orina y el estadio de la glomerulonefritis mesangial proliferativa (Hirano, 1992_b).

Otras entidades

Existen otras entidades relacionadas con la interleucina 6 según trabajos publicados (Akira y col., 1993; Cavaillon, 1993), entre ellas está la trombocitosis reactiva (Suzuki y col., 1991; Hollen y col., 1991). Se ha detectado asimismo una liberación aumentada del receptor soluble de la interleucina 6 en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Honda y col., 1992). Se ha sugerido una acción autocrina o paracrina de la IL-6 en los adenomas productores de ACTH y de la hormona de crecimiento (Velkeniers y col., 1994).

3.7. La interleucina 6 en la leucemia linfática crónica B

Los datos aparecidos en relación a esta citocina en la LLC-B son contradictorios, como se detalla a continuación.

3.7.a. Expresión constitutiva del gen de la IL-6

La expresión del ARNm de la IL-6 en las células leucémicas oscila, según las series, entre el 0-5% (Freeman y col., 1989; Burke y col., 1993) y el 100% (Rambaldi y col., 1993). Biondi y col., 1989, y Plate y col., 1993_b, la encuentran en el 54% de los pacientes estudiados.

3.7.b. Acción de la IL-6 sobre la proliferación y diferenciación celular en la LLC-B

La IL-6 inhibe la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B inducida por el TNF α (Aderka y col., 1993); la inhibición es máxima con 400 pg/ml de IL-6 (Van Kooten y col., 1993_b). Este efecto es revertido con el empleo, en el cultivo, de anticuerpos monoclonales neutralizantes de la IL-6 (Aderka y col., 1993). Se ha sugerido que la IL-6, por su efecto antagonista de la acción del TNF α , que conlleva la inhibición del crecimiento de las células de la LLC-B, podría ser empleada como agente antitumoral en el tratamiento de esta neoplasia de células B (Aderka y col., 1993). Nilsson y col., 1992, encuentran que los anticuerpos frente a la IL-6, o al receptor de la IL-6, no modifican la proliferación de la célula leucémica inducida por activadores policlonales.

Otros autores observan que la IL-6 no realiza ninguna acción, positiva o negativa, sobre el crecimiento celular en la LLC-B (Caligaris-Cappio y col., 1989; Carlsson y col., 1989; Digel y col., 1991; Van Kooten y col., 1992; Jewell y col., 1993). La IL-6 no aumenta la expresión del ARNm del antígeno de activación CD23 en los linfocitos B de la LLC-B (Fournier y col., 1992).

La IL-6 no afecta directamente al crecimiento de la LCP, otra neoplasia hematológica de células B, pero sí media en la síntesis de ADN inducida por el TNF α a través de un mecanismo intracitoplasmático (Barut y col., 1993).

La IL-6 no actúa en la inducción de la diferenciación de los linfocitos B leucémicos al no estimular la producción de inmunoglobulinas (Caligaris-Cappio y col., 1989; Carlsson y col., 1989; Fluckiger y col., 1992; Nilsson y col., 1992; Aderka y col., 1993; Van Kooten y col., 1993_b).

3.7.c. Expresión de los receptores de la IL-6 en la membrana de los linfocitos de la LLC-B y detección del receptor soluble de la IL-6

Mientras que unos autores no encuentran el receptor de la IL-6 en la superficie de membrana de las células leucémicas mediante el empleo de anticuerpos específicos (Nilsson y col., 1992; Aguilar-Santelises y col., 1993), otros objetivan la expresión del receptor de la citocina, aunque a un nivel leve (Lavabre-Bertrand y col., 1992). Plate y col., 1993_b, demuestran la expresión del ARNm del receptor de la IL-6 en los siete pacientes con LLC-B en los que realizan el estudio.

Se ha detectado en el suero de pacientes con LLC-B el receptor soluble de la IL-6 (Aderka y col., 1993).

3.7.d. Presencia de la IL-6 en el suero de los pacientes y producción de la citocina por las células de la LLC-B en cultivo

Los niveles séricos de IL-6 son más elevados en pacientes con estados hipergammaglobulinémicos benignos, que en pacientes con neoplasias de células B, incluyendo la LLC-B y el mieloma múltiple. Los resultados, sin embargo, no permiten separar con nitidez personas sanas de enfermos con LLC-B (Pettersson y col., 1992). Otros grupos de trabajo llegan a conclusiones similares, pues no encuentran niveles elevados de IL-6 en el suero de pacientes con LLC-B (Carrión y col., 1995), excepto en los enfermos en estadio 0 de la clasificación de Rai (Aguilar-Santelises y col., 1992; Aguilar-Santelises y col., 1993). Sin embargo, Burke y col., 1993, detectan IL-6 en el suero de pacientes con LLC-B, cuyo nivel está elevado de forma significativa en relación a personas sanas, aunque de forma no uniforme.

Por lo que se refiere a la producción de IL-6, los resultados son dispares: mientras que hay autores que no la detectan en los sobrenadantes de células de pacientes con LLC-B (Uggla y col., 1987; Burger y col., 1994), otros grupos sí identifican la citocina tras 48 y 72 horas de cultivo, bien en ausencia de todo tipo de mitógeno (Biondi y col., 1989; Burke y col., 1993; Reittie y Hoffbrand, 1994; Carrión y col., 1995), o tras la estimulación con ligandos de inmunoglobulinas (Carrión y col., 1995).

Entre estos dos extremos se encuentran los resultados de otros investigadores, que demuestran que la producción de IL-6 por las células mononucleadas -en concreto los monocitos- de LLC-B, estimuladas con lipopolisacárido, está disminuida (Dahlke y col., 1995). Dicho resultado está de acuerdo con su hipótesis, según la cual, la no diferenciación del linfocito B de la LLC-B a célula plasmática productora de inmunoglobulinas sería debido a la deficiencia de producción de la interleucina 6 (Stryckmans y col., 1988). Esta producción disminuida de IL-6 por parte de los linfocitos tumorales y de los monocitos de esos mismos pacientes es menor cuanto más avanzado es el estadio de la enfermedad (Aderka y col., 1993). Aguilar-Santelises y col., 1993, observan que la IL-6 se produce en mayores concentraciones en pacientes con estadio 0 de la clasificación de Rai.

Por el contrario, Lahat y col., 1991, observan que existe una asociación entre la LLC-B, la enfermedad autoinmune y la secreción espontánea *in vitro* de

interleucina 6, pues las células B de los pacientes con LLC-B con manifestaciones autoinmunes secretan de forma espontánea grandes cantidades de esta citocina. Las células de los pacientes con LLC-B sin fenómenos de autoinmunidad también secretaban interleucina 6 pero en menor cantidad.

3.7.e. Acción de la IL-6 sobre la apoptosis en la LLC-B

La IL-6 no protege de la apoptosis a las células de esta neoplasia hematológica (Dancescu y col., 1992; Buschle y col., 1993; Kobayashi y col., 1993; Rojas y col., 1994).

3.8. Conclusión

Tras el descubrimiento de la interleucina 6 como factor que estimula la diferenciación del linfocito B, y el crecimiento del hibridoma/plasmacitoma, se ha observado también su enorme importancia en la regulación de la respuesta de fase aguda, y en la activación de los linfocitos T. Además, dentro de su espectro de acción se incluyen las esferas hematológicas y neurológicas. Los múltiples efectos de la interleucina 6, contribuyen a una respuesta coordinada del cuerpo a la agresión, de forma que, tras la liberación de interleucina 6 del tejido dañado o infectado, las células T y los precursores hematopoyéticos se hacen respondedores a sus respectivos factores de crecimiento y de diferenciación; se libera ACTH de la hipófisis y se inicia la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, estimulándose la producción de anticuerpos. Si tenemos en cuenta que toda agresión o infección es seguida de una inducción masiva y precoz de interleucina 6, y que prácticamente toda célula es capaz de segregar interleucina 6, parece claro que esta citocina constituye un indicador de agresión tisular. Muchas de las acciones que se atribuían previamente a la interleucina 6, se sabe ahora que son producto de la asociación entre la interleucina 6 y la interleucina 1.

4. CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE CITOMETRÍA DE FLUJO

4.1. Introducción a la citometría de flujo

La citometría de flujo (c. f.) puede ser definida de forma amplia como un sistema para medir y analizar las señales luminosas producidas por la dispersión de un haz de luz al atravesar unas partículas inmersas en un fluido. Para que las señales sean resolutiveas, las partículas han de ir separadas en el fluido. Esto se consigue mediante el enfoque hidrodinámico, que consiste en el alineamiento de las partículas disueltas en el fluido por acción de otro fluido que envuelve al primero. Al penetrar los dos fluidos en una cámara con forma de embudo, se produce un brusco aumento de la velocidad de los mismos, con la consiguiente separación física de las partículas, que cruzan individualizadas el haz de luz.

Los elementos más comunes en todo citómetro de flujo son: a) una fuente de luz. El láser es el generador de luz más frecuentemente utilizado; b) un banco óptico para enfocar y dirigir esa luz; c) fluidos y controles para dirigir y regular el flujo del líquido que contiene las partículas, a través del haz de luz; d) un dispositivo electrónico para medir la intensidad de las señales de luz y grabarlas; y e) un sistema computarizado que analice estas señales de luz al relacionarlas unas con otras.

El punto en el que el haz de luz y el fluido, conteniendo las partículas objeto del estudio, interseccionan se denomina punto de observación. Alrededor del mismo existen lentes que captan luz cuando emerge de su intersección con el fluido. Esta luz emergente constituye la señal, que es enfocada en fotodetectores, los cuales convierten la señal luminosa en pulsos eléctricos, cuya altura es directamente proporcional a la señal luminosa producida por la partícula. Cada fotodetector tiene en frente de él un filtro de luz de un color específico, cuya función es asegurar que cada fotodetector sólo "vea" la luz del color transmitida a través de su filtro. El citómetro transforma el pulso eléctrico en señal digital y la envía al computador.

4.2. Parámetros: "side scatter" y "forward scatter"

La partícula que atraviesa el haz de láser produce una dispersión de luz característica, según sus propiedades. El citómetro recoge la luz dispersada en dos direcciones: frontalmente (en la misma dirección del haz de luz) y perpendicularmente a éste.

En frente de cada uno de los detectores hay colocado un filtro del mismo color que la luz que ilumina -habitualmente azul-, que registrará la señal de luz (azul) que es desviada hacia un lado desde la superficie de una partícula. Cuanto más irregular o granular sea la partícula, más desviará ese haz que ilumina hacia el lado. La intensidad de la así llamada "side scatter light" (SSC) -definida como luz, del mismo color que el haz que ilumina, que es desviada por una partícula a un ángulo de 90° del haz que ilumina-, está relacionada, por lo tanto, con la textura de las partículas que fluyen en el camino de la luz. Se ha denominado también señal de granularidad u "orthogonal light scatter signal". Las células sanguíneas de la serie granulocítica, con sus núcleos irregulares, tienen un SSC mucho más intenso que los linfocitos y eritrocitos.

El resto de tubos fotomultiplicadores que se encuentran en ángulo recto al del haz de luz están generalmente con un filtro verde, naranja y rojo, dependiendo de los detectores que estén presentes en un aparato en particular. Si el haz de luz es azul, entonces no hay forma de que luz roja, naranja o verde emerja del punto de análisis, a menos que una partícula en el fluido esté generando ella misma esa luz roja, naranja o verde. Una partícula emite luz porque contiene compuestos con fluorescencia endógena, o porque se ha unido a un fluorocromo.

La señal "forward scatter" o "forward angle light scatter" se define como luz del mismo color que el haz que ilumina, que es desviada en un ángulo pequeño de la dirección del haz original. Se denomina señal de volumen, pues se relaciona con el tamaño, aunque también con otros factores, como el índice de refracción de las partículas. Por ejemplo, las células muertas aparecen mayores que las células vivas del mismo tipo, cuando se observan por el microscopio óptico; sin embargo, las primeras aparecen más pequeñas que las células vivas con c. f., aunque no lo son realmente; dan simplemente una señal "forward scatter" más débil que las células vivas porque tienen las membranas rotas y el índice de refracción de sus contenidos es, por esta razón, más parecido al índice de refracción del fluido que lo rodea.

Puesto que los parámetros "forward scatter" y "side scatter" diferencian las células según su tamaño y complejidad interna, se usan juntas con frecuencia para el estudio de poblaciones celulares.

4.3. Conceptos básicos de la electrónica en la citometría de flujo

Los fotodetectores convierten señales de luz en pulsos eléctricos, la intensidad de los cuales está en relación con la intensidad de la señal de luz. Los tubos fotomultiplicadores tienen voltajes aplicados a ellos para que la cascada de electrones que se origina del impulso de luz original se convierta en una corriente lo suficientemente grande para ser medida.

Al cambiar el voltaje aplicado al fotomultiplicador se aumenta o disminuye la sensibilidad del tubo. Un segundo método es cambiar la amplificación de la corriente eléctrica tras abandonar ésta el fotodetector. Los amplificadores pueden ser lineales o logarítmicos. Un amplificador logarítmico permite ver señales de luz en un rango amplio de intensidad y un amplificador lineal restringe las medidas sensibles a señales en el mismo rango. Los amplificadores logarítmicos se usan para analizar señales de fluorescencia de células con marcadores de superficie teñidos, porque estas células exhiben con frecuencia un gran rango de intensidad de fluorescencia. Los amplificadores lineales se usan para analizar el contenido de ADN de las células porque dicho contenido no varía habitualmente por más de un factor 2 -por ejemplo, durante la división celular-. Los amplificadores lineales se usan generalmente para analizar las señales de "forward" y "side scatter". Una vez que la señal eléctrica de los fotodetectores se ha amplificado, su intensidad se analiza y el valor se graba por medio de un convertidor analógico digital.

Por lo tanto, hemos iluminado una partícula, registrado la luz que emerge de esa partícula en uno u otro fotodetector -dependiendo del color o de la dirección de la luz emergente-, y convertido la señal de cada fotodetector a una medida de intensidad en una escala de 0 a 255 (ó a 1023). Para cada partícula que ha fluido a través del haz que ilumina, tenemos ahora 4, 5 ó más números, dependiendo del número de los fotodetectores presentes, que nos describen esa partícula. Esos 4 ó 5 números -cada uno en escala de 0 a 255- nos dicen la intensidad de FSC, SCC y de las fluorescencias rojo, verde y naranja de esa partícula, y son la única información de esa partícula de la cual dispone el citómetro. Estos son los hechos que pueden ser correlacionados entre sí para un posterior análisis.

El término canal representa un rango de intensidad de luz específica; la señal de una célula es registrada en uno u otro canal, dependiendo de su intensidad.

El término umbral define un obstáculo. Sólo partículas que dan señales mayores o iguales que ese obstáculo serán registradas en el amplificador de canales del citómetro. El uso más común de este umbral es en la definición de un número de canal en "forward scatter": sólo partículas con una señal de "forward scatter" más brillante que el umbral de canal definido será contado por el citómetro. Mediante el uso del umbral de "forward scatter" se evitan problemas que pueden venir de polvo, restos celulares y ruido electrónico en el sistema.

4.4. El análisis

La "ventana" es un modo de definir las características de las partículas -en términos de FSC, SSC y/o número de canales de intensidad de fluorescencia-, que queremos incluir en nuestro análisis. Por ejemplo un citometrista define una ventana de linfocitos en términos de FSC y SSC.

El histograma representa el número de partículas en cada canal, es decir, todas las células están situadas según el número de canal que caracteriza la intensidad de sus señales. Se puede conocer la intensidad más frecuente (número de canal) para el grupo de células (canal moda), también la intensidad media y la mediana. Los cursores pueden ser usados para definir regiones de intensidad que puedan ser de interés.

La intensidad de la señal en cada región se analiza para determinar la proporción de partículas que son positivas o negativas con relación a un criterio. Las poblaciones con propiedades marcadamente diferentes son fáciles de analizar. Para medir la intensidad de fluorescencia, el canal que representa un límite bajo de positividad se elige colocando el cursor en este canal (canal umbral). El computador determina el número y el porcentaje de células con una intensidad mayor que (positividad) o menor que (negatividad) la intensidad elegida. En situaciones con buena discriminación positiva frente a negativa, los controles negativo e isotipo se usan para determinar el número de canal donde poner el cursor. Generalmente, no más del 2% de población negativa debería contarse como positiva.

En algunas situaciones, poblaciones celulares positivas se entrecruzan en el área negativa del histograma lo que se denomina discriminación positividad-negatividad pobre. En tales casos, la simple posición del cursor no puede ser usada y el análisis de los datos llega a ser más difícil. Esta pobre discriminación es, con

frecuencia, un problema con poblaciones celulares que tienen expresión reducida de antígenos o cuando hay un alto nivel de autofluorescencia o unión inespecífica excesiva del anticuerpo por la población celular. Por lo general, esta pobre discriminación es un problema mucho mayor con los métodos indirectos de fluorescencia que con los directos. En estas circunstancias es preciso aplicar una corrección matemática a los datos para determinar la proporción relativa de células positivas y negativas, aún incluso cuando un cierto grado de error siempre se introduce con esta corrección. Esta consiste generalmente en la sustracción de un histograma "fondo" (control) de aquel que es el histograma "test" ("background subtraction") sobre una base canal por canal. Por lo tanto, si estamos ante un cambio en la intensidad de fluorescencia de una población uniforme de células es mejor usar características de moda, mediana o media de esa población. El uso de un valor de porcentaje positivo conduce a error si estamos ante una población de células fluorescentes, uniforme pero "poco brillante".

El valor moda -número de canal que describe el grupo de células más común- puede variar erráticamente y ser reproducible pobremente si la distribución de la población es ancha. El valor media será incorrecto si un número significativo de células están en los canales más altos o más bajos del histograma. El valor mediana de la población es más reproducible, pero sólo es aplicable si todas las células de una población van a ser analizadas.

Si queremos ir más adelante y correlacionar un parámetro con otro existen los "dot-plot" o "bit-map". Cada partícula se coloca en el "plot" según su canal de intensidad para cada uno de los dos parámetros seleccionados. Los cursores vuelven a dividir los canales de intensidad de luz en áreas de interés. Los cuadrantes definirán las intensidades de tinción que consideramos representarían partículas verdes, rojas, dobles positivas (tanto verdes como rojas) y doble negativas (no teñidas). Las correlaciones entre dos parámetros constituyen el procedimiento habitual para el análisis de la mayor parte de los datos del citómetro.

4.5. La fluorescencia

La fluorescencia es una manifestación de la interacción entre materia y luz a un nivel molecular. Es una propiedad de ciertos compuestos químicos naturales y sintéticos, llamados fluorocromos.

Algunos fluorocromos se unen directa y específicamente a ciertos componentes celulares, como ADN, ARN y proteínas. En otros casos, como ocurre en

el análisis de la mayoría de los antígenos de superficie e intracelulares, se usan diversas técnicas inmunofluorescentes e histoquímicas para unir el fluorocromo a la partícula.

Cuando se usan fluorocromos, la longitud de onda del láser debe ser tal, que éste se excite para emitir luz. Bajo estas circunstancias la señal fluorescente es proporcional a la cantidad de fluorocromo unido, que refleja la cantidad de sustancia presente. A su vez, la morfología del pulso viene influenciado por la distribución del fluorocromo en la partícula.

Están disponibles anticuerpos monoclonales específicos unidos a fluorocromos para muchas moléculas diana -antígenos de superficie linfocitarios específicos, marcadores tumorales, etc-, y se pueden detectar incluso 2×10^3 moléculas fluoresceinadas por célula.

4.6. Aplicaciones de la citometría de flujo

4.6.a Análisis fenotípico de las subpoblaciones celulares

Análisis de los marcadores superficiales celulares

La identificación y cuantificación de antígenos celulares mediante el uso de anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos (inmunofenotipo) es una de las aplicaciones más importantes del citómetro de flujo. Clínicamente el análisis de los marcadores de la superficie celular ha sido útil en la detección de células anormales y en el análisis de células normales que varían en enfermedades diferentes. El citómetro de flujo ha sido de gran valor en la búsqueda de antígenos tumorales y de diferenciación específicos, puesto que puede cuantificar la unión del anticuerpo a células individuales.

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales ha suministrado a los citometristas una larga serie de anticuerpos específicos para el análisis de los antígenos proteicos de la superficie de la membrana del linfocito. Estos antígenos de membrana definen función, línea, estado de diferenciación celular o estructura de la membrana celular. El anticuerpo formará una fuerte unión con el antígeno correspondiente que será visualizada por el fotodetector mediante la adición de una sustancia fluorescente. El análisis de las subpoblaciones celulares por c. f. se

puede acometer mediante dos métodos diferentes, como a continuación se detalla, y según el anticuerpo monoclonal utilizado esté o no conjugado con un fluorocromo.

Técnicas de marcaje

a) Técnica directa:

Con la tinción directa se incuban las células con un anticuerpo monoclonal que ha sido previamente conjugado con un fluorocromo. Este procedimiento es rápido y directo. Conlleva una sola incubación, seguida de varios lavados para eliminar los anticuerpos unidos de forma no específica y débiles. Esta técnica se usa cuando se puede obtener grandes cantidades del anticuerpo monoclonal y se le puede adherir fácilmente un fluorocromo. La unión no específica no es un problema para los anticuerpos monoespecíficos. Sin embargo, la técnica se puede ver limitada si hay autofluorescencia, por la muy baja densidad de ciertos marcadores de superficie, y porque no hay anticuerpos monoclonales, unidos a fluorocromos disponibles para toda sustancia de interés biológico.

b) Técnica indirecta:

Este segundo método incluye la incubación de células con un anticuerpo monoclonal no conjugado con fluorocromo, un lavado para eliminar moléculas unidas de forma inespecífica, y una segunda incubación con un anticuerpo fluorescente -el así llamado segundo estrato-, que reaccionará con la clase general del anticuerpo monoclonal usado en el primer estrato. Por ejemplo, si el primer anticuerpo monoclonal se ha obtenido de una línea de hibridoma de ratón, tendrá las características generales de una inmunoglobulina murina; el anticuerpo del segundo estrato puede ser un anticuerpo fluoresceinado (conjugado con fluoresceína (FITC)) que reaccionará con una inmunoglobulina murina. El anticuerpo primero murino y el anticuerpo de cabra antimurino unido a FITC, son ampliamente usados en la c. f.

Las ventajas de esta técnica en dos estratos son las siguientes:

- Los anticuerpos monoclonales (estrato primero) son mucho más baratos si no están conjugados.
- Un reactivo dado de segundo estrato puede ser usado para visualizar cualquier anticuerpo monoclonal de una clase dada -cualquier inmunoglobulina de ratón en el ejemplo-.
- Cada paso del procedimiento de tinción resulta en amplificación de la intensidad de fluorescencia de la reacción de tinción.

Las desventajas de la técnica indirecta es que emplea más tiempo y supone un segundo paso que duplica la oportunidad para que se produzcan uniones inespecíficas. La tinción indirecta limita también la posibilidad de una tinción simultánea con dos o tres fluorocromos.

Los controles

Previo al análisis de las poblaciones celulares se debe estudiar la fluorescencia de fondo y las uniones inespecíficas del anticuerpo monoclonal usado, que pueden artefactar el estudio.

a) Análisis de la fluorescencia de fondo (autofluorescencia):

Toda partícula no teñida emite alguna fluorescencia y, por tanto, emitirá algo de luz, que atravesará los filtros situados delante de los fotodetectores del citómetro. La autofluorescencia de las células, que procede de constituyentes intracelulares es lo suficientemente brillante para ser detectada y, puede en algunas células ser tan brillante como para limitar nuestra capacidad de detectar tinción positiva por encima de este fondo brillante. Por ello, hay que analizar esta fluorescencia de fondo, previo al estudio de una población celular.

b) Control isotipo:

La tinción de células para el análisis depende de la especificidad antígeno-anticuerpo. Aunque la especificidad entre el punto de unión del anticuerpo y el correspondiente epítipo en el antígeno es exquisito, pueden producirse uniones inespecíficas del anticuerpo a través de su fragmento Fc, a los receptores Fc que existen en la superficie de muchos tipos de células, sobre todo monocitos.

Para analizar las uniones inespecíficas mencionadas antes se debe hacer un control siempre con un anticuerpo de las mismas propiedades que el anticuerpo monoclonal usado en el experimento, pero con una especificidad irrelevante: control isotipo.

c) La compensación:

Un tercer problema es el entrecruzamiento de espectros por lo que se requiere una compensación correcta del aparato.

Análisis con único, doble y múltiple color

El análisis inmunofenotípico de un color (un único anticuerpo) se realiza mediante la tinción de múltiples partes alícuotas de la misma muestra con reactivos de fluoresceína específicos para los antígenos celulares de interés. Es un análisis largo en el tiempo y no se puede obtener información sobre la interrelación entre los antígenos.

El análisis con doble color es la técnica habitual. Cada célula se marca con dos anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos diferentes. Si ambos fluorocromos se excitan por la luz de una longitud de onda común pero muestran diferente espectro de emisión, se puede emplear un láser único. La combinación que más se emplea es fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE). El análisis con dos colores es rápido, coste-efectivo, permite el análisis de muchas suspensiones con un número limitado de células, y da información esencial para la delineación de poblaciones celulares de línea mixta. Además, la aplicación de marcadores funcionales -como por ejemplo, antígenos de activación- a poblaciones celulares específicas es posible con el análisis de doble color.

El uso simultáneo de tres o más anticuerpos monoclonales en el mismo sistema de ensayo es útil cuando se analizan poblaciones celulares complejas. A este respecto, técnicas para el análisis con tres colores utilizan anticuerpos monoclonales unidos con FITC y PE, en conjunción con un tercer anticuerpo monoclonal unido, a su vez, con Rojo Texas, R-ficocianina, aloficocianina u otra partícula fluorescente. Para una mayor sensibilidad y evitar el sobrecruzamiento de espectros, el tercer compuesto fluorescente debería de ser excitado por un segundo láser.

Consideraciones prácticas en la tinción con inmunofluorescencia

a) La viabilidad celular:

El análisis con éxito del citómetro de flujo comienza con una recogida correcta de la muestra y el transporte rápido al laboratorio. Se necesitan aproximadamente 1×10^6 células/ml -100.000 células en total- para cada anticuerpo monoclonal (o mezcla de anticuerpos) usado en el análisis o para la determinación del contenido de ADN. Puesto que la autólisis celular y la pérdida de marcadores de superficie ocurre rápidamente tras la recolección de la muestra, se precisa un análisis rápido o preservarla para posteriores análisis. En general, la viabilidad celular y la expresión antigénica se mantiene durante 24 horas en sangre periférica en un

tubo de extracción que contenga heparina, ácido etilendiaminotetraacético o ácido citrato dextrosa.

La expresión de antígenos de superficie y la unión de los anticuerpos a dichos antígenos se altera por la muerte celular. Las células muertas se unen a los anticuerpos de forma no específica en el citoplasma, disminuyen el título del anticuerpo y disminuyen falsamente la intensidad de fluorescencia de las poblaciones celulares viables positivas. Además, células no viables recubiertas por anticuerpos pueden ser malinterpretadas como células positivas reales. Finalmente, la muerte celular puede ser selectiva para ciertas poblaciones celulares y pueden alterar falsamente el patrón de la expresión de antígenos. Para el análisis inmunofenotípico, una suspensión celular debería tener menos de un 20% de células contaminantes.

La viabilidad celular se determina con azul tripán, eosina, yoduro de propidio (IP), bromuro de etidio (BE) u otros colorantes vitales, polares, altamente cargados, que penetran las células muertas pero no penetran la membrana intacta de la célula viva. Los dos primeros son compuestos no fluorescentes y se usa el microscopio óptico para ver la viabilidad celular cuando se emplean.

Las sustancias fluorescentes -IP, BE, diacetato de fluoresceína (FD)- dan una alternativa más exacta que los colorantes vitales. Los dos primeros son compuestos altamente polares, emiten luz en la región roja del espectro, y sólo pueden entrar en células con membranas celulares dañadas. El IP se prefiere para determinaciones de la viabilidad celular porque está más altamente cargado que el BE y es más fácilmente excluido de las células con membranas intactas. En la variante más reciente de la técnica, se mide fluorescencia de doble color por c. f., usando FD junto a IP o BE. El FD es un compuesto no polar, no fluorescente que atraviesa fácilmente la membrana celular pero que es rápidamente convertido a una sustancia polar, altamente fluorescente (fluoresceína), mediante hidrólisis por esterases en las células viables. La fluoresceína queda atrapada en el interior de las células, lo que da lugar a emisión de fluorescencia verde. En la práctica, la suspensión celular se tiñe con soluciones de FD e IP y la proporción de células con fluorescencia verde alta y fluorescencia roja baja (las células viables) y/o las células con fluorescencia verde baja y roja alta (células muertas) se determina por c. f.

b) La concentración celular:

El anticuerpo monoclonal debe estar presente en cantidades adecuadas para la saturación completa de marcadores de la superficie celular. Si hay un exceso de células presentes durante la tinción, quedan entonces lugares de unión al anticuerpo libres (por exceso de antígeno) y, por lo tanto, se realiza una estimación falsamente negativa de la proporción de la población celular. Aunque una

concentración celular baja no interfiere con la tinción, se precisa un número adecuado (5.000 a 10.000 células por tubo) para un análisis por c. f. estadísticamente válido. Al realizar la técnica se deben tener en cuenta los volúmenes de la muestra y reactivos, la temperatura y el tiempo de la incubación. En los reactivos comerciales, el fabricante recomienda un procedimiento para conseguir una separación máxima entre poblaciones celulares positivas y negativas, y la máxima intensidad de fluorescencia de las poblaciones positivas. Sin embargo, cada laboratorio debe verificar que las recomendaciones del fabricante son óptimas.

c) La selección del anticuerpo monoclonal:

La selección del anticuerpo monoclonal para la tinción de inmunofluorescencia es compleja debido al gran número de preparaciones disponibles. En la práctica, es una cuestión de experiencia y familiaridad y cada laboratorio debe documentar la reactividad de cada anticuerpo usado. Incluso anticuerpos monoclonales que parecen tener la misma especificidad pueden dar lugar a resultados diferentes, dependiendo del isotipo, el fluorocromo usado y otros factores (Kootte y col., 1988).

De forma reciente se ha conseguido la detección simultánea de dos subgrupos de leucocitos para cada cromóforo usado y, hasta cinco subtipos celulares en la misma parte alícuota, usando fluorescencia en dos colores y un láser. Esto permite la cuantificación simultánea de células T helper, T supresoras, linfocitos B, monocitos y células NK (Horan y col., 1986).

d) Técnicas de tinción sensibles:

La detección y cuantificación de moléculas que están expresadas en número bajo en la superficie celular ha sido difícil de llevar a cabo. Con técnicas de rutina el límite de detección mediante c. f. de moléculas marcadas con FITC es aproximadamente de 3.000 por célula. Además, se debe considerar la autofluorescencia, que puede ser equivalente a más de 30.000 moléculas de fluoresceína por célula (Corsetti y col., 1988). Prácticamente, esto permite la detección de la expresión del CD2 (alrededor de 40.000 moléculas por célula) y de CD25 en células T activadas (más de 30.000 moléculas por célula) pero no de receptores de linfocinas y de factores de crecimiento (menos de 500 moléculas por célula) o de CD25 en las células no activadas (también menos de 500 moléculas por célula).

Existen actualmente técnicas de tinción altamente sensibles para la detección de moléculas que se expresan en bajo número sobre la superficie celular. Una reciente permite la detección reproducible de menos de 100 moléculas de

anticuerpo unido a moléculas por célula. Es una técnica de inmunofluorescencia de tres capas con un anticuerpo monoclonal que reacciona con una inmunoglobulina biotinilada y ficoeritrina-estreptavidina (Zola y col., 1990).

4.6.b. Separación celular ("sorter")

Algunos citómetros de flujo presentan la capacidad de separar físicamente las células, en función de características (difracción de la luz, presencia de fluorocromos, etc) que se hacen servir para su análisis. Estos aparatos, denominados "sorters" o separadores celulares, permiten obtener poblaciones determinadas y realizar estudios funcionales con ellas. Las posibilidades de separación que brinda la c. f. son muy importantes, especialmente cuando se trata de poblaciones muy minoritarias que se caractericen por más de un marcador simultáneo.

4.6.c. El ciclo celular

La c. f. es también aplicable al análisis del ciclo celular, ya que puede cuantificar el número de células en las distintas fases del ciclo celular.

Las células reproductoras no fecundadas contienen ADN en un único lote de cromosomas no emparejados; son células haploides (N). Las células no reproductoras del mismo organismo son diploides (2N) y contienen un lote de cromosomas emparejados y dos veces la cantidad de ADN de las células haploides. Las células que no se están dividiendo, como les ocurre a las células mononucleadas de sangre periférica, son diploides normalmente, están en la fase G_0 y no están proliferando. Las células que están proliferando -como ocurre con las células epiteliales-, contienen cantidades diferentes de ADN, variando de diploide (fase G_0/G_1) a tetraploide (4N), justo antes de la división celular.

El ciclo celular comienza con la fase G_1 . Las células de esta fase tienen el contenido de ADN diploide y son indistinguibles de las células en la fase G_0 , pero están preparándose para sintetizar ADN. Cuando las células en la fase G_1 entran en la fase S, comienzan a duplicar su ADN y a crear otro lote de cromosomas emparejados. Cuando las células terminan este proceso de duplicación, entran en la fase G_2 , donde se preparan para dividirse. Estas células han aumentado la cantidad de ADN de diploide a tetraploide. Las células entran pronto en la fase M,

dividiéndose en dos células hijas, cada una de las cuales contiene el número $2N$ de cromosomas y una cantidad diploide de ADN.

Para el estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo se emplea el IP, sustancia naranja-rojo que se une a los ácidos nucleicos de doble cadena. Si se usan procedimientos de tinción con IP recomendados, que incluyen enzimas para destruir el ARN de doble cadena, el detector FL-2 del citómetro es una medida de la cantidad de IP unido al ADN. La cantidad de fluorescencia es proporcional al contenido de ADN de la célula.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

FUNDAMENTO DE ESTE TRABAJO

El fundamento de este trabajo de investigación se ha basado en los siguientes conceptos:

1. La transformación maligna, que lleva a un crecimiento celular no restringido, puede ocurrir cuando una célula adquiere la capacidad de producir y responder a factores endógenos a través de receptores celulares de membrana o intracitoplasmáticos. Este proceso se ha denominado estimulación autocrina (Sporn y Roberts, 1985). El conocimiento de los mecanismos de estimulación autocrina tiene importancia, por la posibilidad de identificar un punto de intervención terapéutica. En algunos casos, anticuerpos frente a factores de crecimiento impiden, casi por completo, el crecimiento de las células estimuladas de forma autocrina, aunque en muchas ocasiones, esta inhibición es parcial o nula. Se ha demostrado que los factores de crecimiento y sus receptores pueden interactuar también en un compartimento intracelular para dar lugar a una respuesta proliferativa. En esa localización, la interacción entre el factor de crecimiento y su receptor no sería accesible a la acción de las moléculas de anticuerpo empleadas (Lang y Burgess, 1990). Del mismo modo que se describe el proceso de estimulación autocrina, existe igualmente un mecanismo de inhibición autocrina, similar al descrito pero con acción supresora del crecimiento celular (Sporn y Roberts, 1985).
2. Tanto el mieloma múltiple como la leucemia linfática crónica B son neoplasias clonales de la célula B, con características paralelas y divergentes. Aunque en las dos enfermedades está afectada la célula B, el fenotipo de la célula tumoral varía considerablemente. Las alteraciones citogenéticas y protooncogenes asociados con ambas neoplasias son diferentes (Barlogie & Gale, 1992). Ambas entidades aparecen en personas de edad avanzada y, en ocasiones, siguen un curso indolente. Estos hechos hacen suponer que los avances en el conocimiento de los factores que intervienen en la patogenia del mieloma múltiple ayudarían a aclarar aspectos patogénicos de la LLC-B y viceversa.

3. Se ha demostrado que la interleucina 6 puede actuar en el mieloma múltiple como un factor de crecimiento autocrino (Kawano y col., 1988). Así, las células de mieloma múltiple humano producen interleucina 6 y expresan en su membrana el receptor de dicha citocina. Además, ciertas líneas de mieloma proliferan *in vitro* en respuesta a la interleucina 6 exógena, crecimiento que se inhibe al añadir al medio un anticuerpo frente a la interleucina 6 (Kawano y col., 1988).

Este proyecto trata de estudiar el papel de la interleucina 6 en la LLC-B, analizando si esta citocina se comporta de modo parecido o no a como lo hace en el mieloma múltiple. Es decir, si la interleucina 6 es o no un factor autocrino en el desarrollo de la LLC-B.

OBJETIVOS

Los objetivos que se han planteado a la hora de realizar este trabajo de investigación son los siguientes:

1. Realizar un estudio fenotípico detallado de la LLC-B, analizando la expresión del receptor de la interleucina 6 en la superficie de membrana de las células B leucémicas.
2. Estudiar el efecto de la interleucina 6 humana recombinante sobre la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B y si este efecto revierte al emplear un anticuerpo monoclonal específico frente a esa citocina. Asimismo, analizar la acción de otros mitógenos (éster del forbol, fitohemaglutinina, interleucina 2) sobre la proliferación de dichas células.
3. Determinar la producción de la interleucina 6 y del receptor soluble de esta citocina por parte de los linfocitos B de la LLC-B, tanto de forma espontánea como tras el estímulo con un éster del forbol.
4. Estudiar el efecto de la interleucina 6 humana recombinante sobre la diferenciación de las células B de la LLC-B.

5. Determinar si existe relación entre la producción de interleucina 6 por parte de los linfocitos B de la LLC-B y el desarrollo de fenómenos de autoinmunidad.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Aparatos

- Incubador de agua de 37°C con agitación continua (Unitronic, Selecta, España).
- Cámara de flujo laminar (Telstar S.A, Tarrasa, España).
- Centrífuga refrigerada Sorvall RC-3 (Dupont Instrument, Conn, EEUU).
- Centrífuga de mesa IEC HN-SII (Damon/IEC, MA, EEUU).
- Microcentrífuga Centrifuge 5414S (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
- Estufa de cultivo celular Napro 6100 (Napro, Portland, EEUU).
- Microscopio de fluorescencia Leitz-Dialux 20 EB (Leitz, Wetzlar, Alemania).
- Microscopio invertido de contraste de fase Nikon TMS (Nikon, Japón).
- Congelador de -70°C Forma Biofreezer 8200 (Forma Scientific, Marietta, Ohio, EEUU).
- Congelador de -20°C Arctis 330 GS (AEG, Alemania).
- Lavador de placas de ELISA de doce canales (Titertek, Flow Lab., Reino Unido).
- Espectrofotómetro Titertek Multiskan (Flow Lab., Irvine, Ca, EEUU).
- Colector de cultivos SKATRON AS (Flow Lab., Lieberbeyen, Noruega).
- Dispensador de líquido de centelleo (Accupenser, Nichiro, Japón).
- Contador beta Rackbeta (LKB-Wallac, Finlandia).
- Citómetro de flujo Facscan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, California, EEUU).

1.2. Productos

- Heparina Leo al 5% (Laboratorios Leo, Madrid, España).
- Suero salino fisiológico (SSF) Apiroserum Clorurado simple (Cloruro sódico) (Ibys, Madrid, España).
- Lymphoprep TM, densidad 1077 (Nyegaard Co, Oslo, Noruega).
- Azul Tripán (Fluka, Chemische Fabrik, Buchs, SG).

- Suero anti-inmunoglobulina de ratón, fluoresceinado (Kallestad, Austin. Tx, EEUU).
- Anticuerpos monoclonales (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, California, EEUU). Para la identificación y cuantificación de los antígenos celulares mediante citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD5, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD45, anti-HLA DR, anti-CD25, anti-CD71, anti-cadena ligera lambda y kappa de las inmunoglobulinas. De ellos, unidos a fluorocromo verde (fluoresceína) fueron: anti-CD19, anti-CD8, anti-CD5, anti-CD45, anti-CD25 y anti- λ ; unidos a fluorocromo rojo (ficoeritrina): anti-CD56, anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD71, anti- κ ; y unidos a fluorocromo naranja (tercer color): anti-CD4, anti-CD19, anti-CD20, anti-HLA DR. Como control se empleó un anticuerpo de las mismas propiedades que el anticuerpo monoclonal usado en el experimento, pero con una especificidad irrelevante (control isotipo) y de la misma casa comercial.
- Anticuerpo monoclonal frente al receptor de la interleucina 6 (R&D Systems, EEUU).
- Anticuerpo monoclonal murino frente al receptor (gp80) de la interleucina 6 humano (Bio-Synthesis D&I, s.a.).
- Interleucina 6 humana recombinante (Promega).
- Interleucina 6 humana conjugada con ficoeritrina (R&D Systems, Inc., Minneapolis, EEUU).
- Interleucina 2 recombinante (Hoffman-La Roche IAC., Nutley, EEUU).
- Fitohemaglutinina M (PHA) (Difco, Detroit, Michigan, EEUU).
- Phorbol 12, 13-Dibutyrate (PDB) (Sigma, Mo, EEUU).
- Medio RPMI 1640 with 25 mM Hepes Buffer, with L-Glutamine (BioWhittaker. Walkersville, Maryland 21793, EEUU).
- L Glutamina (Flow Lab, Irvine, Ca, EEUU).
- Hepes 1M (Flow Lab, Irvine, Ca, EEUU).
- Mezcla antibiótica compuesta por: cloxacilina 500 mg, ampicilina 500 mg, gentamicina 80 mg para 50 cc.
- Suero bovino fetal (Gibco, Grand Island, NY, EEUU).
- Timidina tritiada, actividad específica 1 mCi/ml (Radiochemical Center, Amersham, Reino Unido).
- Solución de centelleo Normascint (Scharlan, Ferosa, España).
- Anticuerpos específicos frente a la cadena α , γ , μ de la IgG humana, desarrollada en cabra (Sigma Chemical Co, St. Louis, EEUU).

- Anticuerpos específicos, desarrollados en cabra, frente a la IgA, IgG, IgM humanas y conjugado con peroxidasa -Sigma Horseradish Peroxidase, Type VI- (Sigma Chemical Co, St. Louis, EEUU).
- Cápsulas de Buffer Carbonato-Bicarbonato (Sigma Chemical Co, St. Louis, EEUU).
- Cápsulas de Buffer Fosfato-Citrato con Perborato sódico (Sigma Chemical Co, St. Louis, EEUU).
- O-Phenylenediamine (OPD) Dihydrochloride (Sigma Chemical Co, St. Louis, EEUU).
- Tween 20 (Merck, art. 822184).
- Inmunoensayo para la determinación cuantitativa de las concentraciones de interleucina 6 humana en suero y sobrenadantes (R&D Systems, Inc., Minneapolis, EEUU).
- Inmunoensayo para la determinación cuantitativa de las concentraciones del receptor soluble de la interleucina 6 humana en suero y sobrenadantes (R&D Systems, Inc., Minneapolis, EEUU).
- Medio completo: se utilizó RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM y la mezcla antibiótica antes señalada al 1%.
- Medio de cultivo: se utilizó Medio completo, al que se añadió suero bovino fetal al 10%.
- Disolución salina fosfatada (PBS). Por cada litro de agua destilada se disolvieron 8.75 g de PO_4HNa_2 , 1.89 g de $\text{PO}_2\text{H}_2\text{K}$ y 4.25 g de ClNa ; se ajustó el pH a 7.4.

2. PACIENTES Y MUESTRAS DE SANGRE

2.1. Pacientes

Las muestras de sangre utilizadas para la realización de este estudio fueron obtenidas entre diciembre de 1992 y julio de 1994 de treinta y nueve pacientes, diagnosticados de LLC-B, según los criterios anteriormente expuestos (Montserrat, 1992). Los pacientes provenían de los Servicios de Hematología (35), Medicina Interna I (1), Medicina Interna II (1), Gastroenterología (1) y Cirugía Digestivo (1), de la Clínica Puerta de Hierro.

De los treinta y nueve pacientes catorce eran varones y veinticinco mujeres, con una edad media de 65 años (rango: 46 - 82).

La distribución de los pacientes por estadios, en el momento de recogida de las muestras, fue la siguiente: veintidós pacientes se encontraban en el estadio 0 de Rai; cinco en estadio I; nueve en estadio II; uno en estadio III y dos en estadio IV. Por lo que hace referencia al sistema de estadiaje de Binet, treinta y uno de los pacientes estaban incluidos en el estadio A; cinco en el estadio B y tres en el estadio C.

Ningún paciente había recibido tratamiento quimioterápico previo por su LLC-B. Sólo un paciente había presentado manifestaciones autoinmunes, que consistieron en la positividad de la prueba de Coombs directo, en ausencia de anemia o de otro fenómeno inmunológico (Tabla 4). Ninguna de las muestras incluidas en el estudio procedía de pacientes con paraproteinemia monoclonal.

2.2. Muestras recogidas

En cada paciente se obtuvieron dos muestras de sangre mediante punción en vena periférica:

a) 10 a 30 ml de sangre total, recogida en tubos comerciales que contenían heparina cálcica al 0.1%.

b) 10 ml de sangre total, recogida en tubos comerciales sin anticoagulante, de donde se obtuvo suero por centrifugación de la muestra a 800 g, durante 10 minutos.

Las muestras de sangre heparinizada se procesaron en los 30 minutos siguientes a su extracción, en condiciones de esterilidad. El suero se conservó congelado, a -70°C , en partes alícuotas de 0.5 ml, hasta su utilización.

TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DE LOS 39 PACIENTES CON LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B

Paciente	Edad	Sexo	Estadio de Rai	Estadio de Binet	Fenómenos autoinmunes
1	57	M*	I	A	-
2	47	V	II	A	-
3	74	M	IV	C	-
4	64	M	III	C	-
5	72	M	O	A	-
6	71	M	O	A	-
7	65	V	II	A	-
8	71	V	O	A	-
9	66	M	II	B	-
10	82	M	O	A	-
11	76	M	O	A	-
12	68	V	O	A	-
13	62	M	O	A	-
14	65	M	O	A	-
15	63	V	O	A	-
16	54	M	II	B	+**
17	46	V	I	A	-
18	65	M	O	A	-
19	81	M	II	A	-
20	62	V	O	A	-
21	65	M	O	A	-
22	63	V	O	A	-
23	75	M	O	A	-
24	57	M	O	A	-
25	59	M	O	A	-
26	60	V	I	A	-
27	62	M	II	B	-
28	78	V	IV	C	-
29	71	V	O	A	-
30	55	M	O	A	-
31	70	V	II	B	-
32	56	M	II	B	-
33	69	M	II	A	-
34	60	V	O	A	-
35	78	M	O	A	-
36	46	V	I	A	-
37	57	M	O	A	-
38	74	M	I	A	-
39	69	M	O	A	-

* V: Varón; M: Mujer

** Prueba de Coombs directo positivo.

3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE TOTAL: OBTENCIÓN DE LA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS B LEUCÉMICAS

Las muestras de sangre heparinizada fueron procesadas, con el fin de obtener la población de células B leucémicas lo más purificada posible para realizar los estudios que se mencionan más adelante.

3.1. Obtención de las células mononucleadas de sangre periférica (CMSP)

a) Se hicieron diluciones de la sangre del paciente al 1:2 o al 1:4, con suero salino fisiológico (SSF), según el conteo leucocitario previo.

b) Una vez realizada la dilución, se procedió a la separación mediante gradiente de densidad sobre ficoll (Böyum, 1968). Se depositaron 30 ml de la sangre diluida en tubos de plástico de 50 ml y se añadieron cuidadosamente 10 ml de ficoll, en proporción de 1 ml de ficoll por cada 3 ml de la dilución de sangre y SSF.

c) Las muestras se centrifugaron a 600 g durante 40 minutos, quedando una banda blanquecina en la interfase sangre-ficoll y un sedimento, donde se depositaron los hematíes. Se recogieron con una pipeta las células de la interfase, que contenía las células mononucleadas de sangre periférica (linfocitos B, T, células NK y monocitos).

d) Se realizaron tres lavados de las células recogidas, resuspendiéndolas en 50 ml de SSF, y centrifugando posteriormente a 400 g, durante 10 minutos, a 4°C. El precipitado obtenido tras el tercer lavado se resuspendió en medio completo (RPMI suplementado con suero bovino fetal), hasta alcanzar una concentración aproximada de 5×10^6 células/ml.

3.2. Exclusión de linfocitos T de las CMSP obtenidas, por roseteo con hematíes de carnero tratados con AET

Para la purificación de las poblaciones linfocitarias se utilizó la propiedad que tienen los linfocitos T de formar rosetas de manera espontánea con los hematíes de oveja (Jondal y col., 1972; Kaplan y col., 1976; Madsen y col., 1980).

3.2.a. Preparación del AET

Los hematíes se extrajeron por punción de vena yugular del carnero del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Se diluyeron, volumen a volumen, en condiciones de esterilidad en solución de Alseviars (20.1 g de dextrosa; 9.10 g de citrato sódico y 4.2 g por litro de agua destilada, pH: 6.1). Antes de su utilización en cada experimento, los hematíes de carnero se lavaron tres veces con SSF y se disolvieron al 12% en solución de 2-amino-ethylisothiuroniumbromide -AET- (2 g en 50 ml de agua destilada, ajustando el pH a 9 con NaOH 10 N), incubándose 15 minutos a 37°C. Se lavaron con SSF y se diluyeron finalmente al 12% en medio RPMI.

3.2.b. Exclusión de los linfocitos T de las CMSP

La técnica se realizó de la siguiente manera:

a) La suspensión de CMSP se mezcló, a la concentración de 3×10^6 células/ml, con otra suspensión de hematíes de oveja tratados con AET, en una proporción aproximada de 30×10^6 células mononucleadas por cada ml de la solución de AET-hematíes de oveja al 12%.

b) La muestra se centrifugó a 250 g durante cinco minutos a 4°C y se incubó posteriormente a 4°C durante 60 minutos. Después de esta incubación se resuspendieron los sedimentos suavemente y se procedió a una nueva separación mediante gradiente sobre ficoll, de la forma anteriormente detallada.

c) Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación quedó una nueva banda blanquecina en la interfase de la suspensión CMSP-ficoll, que contenía los linfocitos B, las células NK y los monocitos de sangre periférica del paciente. También quedó un sedimento constituido por AET-hematíes de oveja, unidos a los linfocitos T de la muestra.

d) A continuación, con una pipeta se recogió la interfase, realizando posteriormente dos lavados. El sedimento, donde presumiblemente se encontrarían los linfocitos T del paciente, se desechó por no necesitarlo en experimentos posteriores.

Al final de este proceso, al igual que tras la obtención de la suspensión de CMSP, se hizo un conteo y un estudio de la viabilidad de la población obtenida. La concentración celular se determinó en una dilución al 1:10 de la suspensión celular, con azul tripán al 0.2% (0.450 ml de azul tripán al 0.2% y 0.050 ml de suspensión celular) y se realizó posteriormente un recuento celular con el microscopio óptico, utilizando la cámara de Neubauer. El porcentaje de células vivas se estableció por la capacidad de exclusión del colorante.

En un principio, a las células deplecionadas de rosetas se las sometió a otro paso de purificación mediante citotoxicidad dependiente de complemento, usando un anticuerpo monoclonal anti-CD3 para eliminar los linfocitos T residuales, y un anti-CD11b para la depleción de monocitos. Al no mejorar los resultados obtenidos, en relación a la purificación de células leucémicas, se abandonó este procedimiento.

3.3. Exclusión de las células adherentes (monocitos)

Esta técnica se ha llevado a cabo únicamente en las primeras muestras de sangre recogidas, y siempre previamente a la exclusión de los linfocitos T por roseteo con hematíes de oveja tratados con AET. Consta de los siguientes pasos (Fisher y col., 1981):

a) Las CMSP se resuspendieron en RPMI con 20% de SBF, hasta conseguir una concentración final de 2×10^6 células/ml. Se dispensaron 25 ml en cada frasco de cultivo de 75 cm² y se incubaron horizontalmente durante una hora a 37°C, con una atmósfera humidificada y con 5% de CO₂.

b) Las células mononucleadas no adherentes se decantaron en un tubo de centrifuga. Se lavó el frasco de cultivo suavemente con RPMI completo a 37°C, y se añadió el resultado de este lavado al tubo de centrifuga.

c) Para terminar se realizaron dos lavados como se ha explicado anteriormente. Se resuspendieron las células en medio completo, y se practicó el conteo, al tiempo que se analizó la viabilidad celular.

d) Las células adherentes (los monocitos) se desecharon, por no necesitarlas en los experimentos posteriores.

Esta técnica no se continuó realizando porque la mayoría de las muestras de sangre de los pacientes de LLC-B de esta serie no tenían entre las CMSP un porcentaje de monocitos lo suficientemente elevado que artefactara el resultado de los experimentos; además, en este paso se perdían células no adherentes.

4. PARÁMETROS ANALIZADOS

En cada muestra de linfocitos B purificados y de suero se realizó:

- a) Estudio fenotípico de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo.
- b) Análisis de la proliferación de las células B en cultivo.
- c) Estudio de la interleucina 6 y del receptor soluble de la citocina en los sobrenadantes de las células en cultivo.
- d) Detección de la interleucina 6 y del receptor soluble de la citocina en el suero.
- e) Estudio de la diferenciación del linfocito B leucémico bajo el estímulo de la interleucina 6.
- f) Análisis del receptor de la interleucina 6 en las células B en cultivo.
- g) Estudio de los antígenos de activación en las células B leucémicas.
- h) Estudio del ciclo celular en los linfocitos B de la LLC-B en cultivo.

4.1. Caracterización fenotípica de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo

Este estudio se ha realizado en las CMSP y en la población de células B ya purificada, lo que permitía conocer el grado de contaminación por linfocitos T, células NK y monocitos de esta última población.

4.1.a. Anticuerpos monoclonales utilizados

En el estudio de las muestras celulares se han utilizado los siguientes anticuerpos monoclonales frente a antígenos de superficie de membrana (Tabla 5):

a) CD45, CD3, CD4, CD8, CD56, CD16, CD14, CD19, CD20, HLA DR: tenían como fin el análisis del porcentaje de las diferentes poblaciones celulares en sangre periférica y el estudio de la proporción de células T, B, monocitos y NK en el grupo celular ya purificado.

b) anticuerpo anti-lambda (λ), anti-kappa (κ): para el estudio de la monoclonalidad de la población B.

c) CD5: se empleó como identificación de la población leucémica, puesto que los linfocitos B de la LLC-B tienen como característica la expresión del CD5 en su membrana.

d) CD71 y CD25: encaminados al estudio del grado de activación y proliferación celular.

e) La IL6 (marcada con PE) y el anticuerpo monoclonal anti R-IL6 (no conjugado): para el estudio de la expresión del R-IL6 en la superficie de la membrana de las células.

Se ha realizado un análisis con un único color en el estudio del anticuerpo monoclonal frente al receptor de la IL6, y con doble y triple color, con las combinaciones que a continuación se citan (cuando se han utilizado tres anticuerpos monoclonales, el primero se ha usado conjugado con FITC, el segundo con PE, y el tercero de ellos con TC):

- CD19-CD8, CD56-CD3, CD4: Se emplean cinco anticuerpos monoclonales en la misma alícuota, dos conjugados con FITC, dos con PE y uno con TC, respectivamente. Con ellos se ha valorado la población de linfocitos T total (CD3), junto a las subpoblaciones CD4 y CD8 (inductor y supresor), la de los linfocitos B (CD19) y la población de células NK (CD56).

- CD5, CD19, DR: Esta combinación se ha utilizado para valorar la población leucémica, pues las células de la LLC-B, por ser de fenotipo B, expresan el CD19 y el DR. Con esta combinación de anticuerpos las células leucémicas son triplemente positivas.

TABLA 5. LISTA DE ANTÍGENOS EMPLEADOS. INTERVALO DE NORMALIDAD PARA LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN SANGRE PERIFÉRICA

Denominación CD*	Intervalo de normalidad (%)	Expresión celular principal
CD3	60-85	Linfocitos T
CD4	29-59	Linfocitos T, HLA clase II
CD5	-	Linfocitos T, subpoblación de Linfocitos B
CD8	19-48	Linfocitos T, HLA clase I
CD14	-	Monocitos
CD16	-	Células NK, Granulocitos, Macrófagos
CD19	7-23	Linfocitos B
CD20	-	Linfocitos B
CD25	-	Linfocitos B y T activados, Macrófagos activados
CD45	-	Leucocitos (Antígeno leucocitario común)
CD56	6-29	Células NK
CD71	-	Linfocitos B y T activados, células en proliferación

* "Cluster differentiation"

- CD45, CD14, DR: Sirve para valorar el porcentaje de monocitos de la muestra. Los monocitos son triplemente positivos con esta combinación de anticuerpos monoclonales. También se utiliza para la determinación de la viabilidad celular.

- anticuerpo anti- λ , anti- κ , CD19: Sirve para el análisis de la monoclonalidad de las células. Las células de la LLC-B serán doblemente positivas para el CD19, por ser linfocitos B, y para λ o κ , pero no para las dos cadenas ligeras de las inmunoglobulinas.

- CD19, CD20, CD5: Se ha usado esta combinación de anticuerpos monoclonales para estudiar la expresión del antígeno de superficie CD20. Al mismo tiempo, ha sido útil este análisis porque, incluso anticuerpos monoclonales que parecen tener la misma especificidad pueden dar lugar a resultados diferentes dependiendo del fluorocromo usado. Así, se ha utilizado el anti-CD19 conjugado con FITC, con PE y TC. Además, el anti-CD5, otro anticuerpo clave en el diagnóstico de la LLC-B, se ha usado conjugado con FITC y TC.

- CD25, CD71, CD19: Con esta combinación de anticuerpos monoclonales se ha valorado la expresión de la cadena alfa del receptor de la interleucina 2 (CD25) y el porcentaje de las células en proliferación (CD71); todo ello sobre células B (CD19).

- CD5, R-IL6, CD19: Se ha valorado así la expresión del receptor de la interleucina 6 en la membrana de superficie de la célula leucémica (CD5 y CD19 positivas). Se ha empleado la IL-6 conjugada con PE y un anticuerpo monoclonal frente al receptor de la citocina.

4.1.b. Procesamiento de las muestras para su análisis

Se han empleado dos técnicas de procesamiento de las muestras, según el anticuerpo monoclonal utilizado estuviera o no conjugado con un fluorocromo:

4.1.b.1. Inmunofluorescencia directa

Se ha empleado cuando el anticuerpo monoclonal estaba conjugado con un fluorocromo. Ha sido el caso de los anticuerpos frente a los antígenos: CD3, CD4,

CD8, CD56, CD16, CD14, CD19, CD20, CD5, HLA DR, CD71, CD25, anti- κ y anti- λ . Como sustrato se ha usado la suspensión celular a estudiar (CMSP o población purificada de linfocitos B leucémicos), siguiendo los pasos que a continuación se detallan:

1) Se mezclaron 0.5×10^6 células -en un volumen de 100 microlitros- con el anticuerpo monoclonal, ya unido a la sustancia fluorescente (FITC, PE, tercer color). La cantidad de anticuerpo monoclonal conjugado osciló entre 5 y 20 microlitros, según la titulación previamente hecha en nuestro laboratorio con controles sanos.

2) Se incubó la suspensión durante 15 minutos a 4°C.

Sólo en el análisis del receptor de la interleucina 6 en la superficie de los linfocitos B, y por indicación del fabricante, la incubación se prolongó hasta una hora. Además, previamente, la solución celular había permanecido 30 minutos a 37°C para que se separara la posible IL6 endógena de los R-IL6 y dejaran a éstos libres para su unión con la IL6 exógena conjugada, evitando falsos negativos. Es un método indirecto de medida de la expresión del receptor de la IL-6, pues lo que se analiza es la presencia de la citocina, conjugada con PE, en la superficie celular.

3) Se realizó un lavado con PBS al 1% y a 4°C, durante 10 minutos.

4) Se resuspendieron las células, y se fijaron con formaldehído al 2% hasta el análisis con el citómetro de flujo en un plazo máximo de 7 días, a partir de entonces.

4.1.b.2. Inmunofluorescencia indirecta

El estudio de la expresión del receptor de la IL-6 en los linfocitos B de la LLC-B se ha realizado también con un anticuerpo monoclonal, no conjugado con fluorocromo, y específico frente a ese antígeno. La técnica cuenta con los siguientes pasos:

1) Se mezclaron 0.5×10^6 células, en un volumen de hasta 100 microlitros, con 50 microlitros del anticuerpo monoclonal no conjugado.

2) Se incubó la suspensión durante 30 minutos a 4°C y se realizó un lavado con PBS al 1%, a 4°C y durante 10 minutos.

3) Se aplicó una solución al 1:100 -según titulación previa- de la fracción F(ab)'₂ de una inmunoglobulina de cabra -marcada con fluoresceína- anti-Ig de ratón, para evitar uniones inespecíficas a las CMSP.

4) Se repitió el proceso de incubación -30 minutos a 4°C- evitando la luz tras lo que se realizó un nuevo lavado. Al final se resuspendieron las células en una disolución fijadora de formaldehído al 2% hasta el análisis por el citómetro.

4.1.c. Estudio de la viabilidad celular y controles

Estudio de la viabilidad celular

La suspensión celular se tiñó con una solución de yoduro de propidio, de forma que la proporción de células con fluorescencia roja alta (células muertas) se pudo determinar por citometría de flujo.

Controles realizados

- Autofluorescencia: Se procesó una muestra que sólo contenía la suspensión celular objeto del estudio, sin añadir ningún anticuerpo monoclonal, con objeto de valorar la autofluorescencia.

- Control isotipo: En todos los casos se empleó un anticuerpo con las mismas propiedades que el anticuerpo monoclonal usado en el experimento, pero con una especificidad irrelevante. Se analizaron de esta forma las uniones inespecíficas del anticuerpo a través de su fragmento Fc, a los receptores Fc que existen en la superficie de otros tipos de células.

4.1.d. Análisis en el citómetro de flujo

Adquisición de las muestras celulares

Las muestras fueron estudiadas en el citómetro de flujo. La adquisición se hizo en un "Facscan" (Beckton Dickinson), por su programa "Lysys II". Previamente, y con un control sano, se ajustó el umbral para la fluorescencia verde, roja y naranja, así como la compensación entre ellas, para evitar falsos positivos en el análisis de los datos. Se han utilizado amplificadores logarítmicos para amplificar

la señal eléctrica de los fotodetectores, que son los que se usan generalmente para analizar señales de fluorescencia de células con marcadores de superficie teñidos.

Análisis de las muestras adquiridas

El análisis de los datos se realizó utilizando los programas "Lysys II" y "Paint a Gate", estudiando un parámetro -con el histograma-, o bien comparando dos de ellos -con el "dot plot"-.

El porcentaje de células que expresaban el antígeno de superficie de interés se determinó colocando primero un cursor en un canal de fluorescencia, utilizando para ello un control monoclonal negativo de la misma clase de inmunoglobulina. La posición del control negativo se situó en un canal donde el 3% o menos de las células eran positivas para el control negativo. Esta era la forma más adecuada de descubrir una población mixta, constituida por células no teñidas y teñidas de forma intensa. Sin embargo, cuando existía un cambio en la intensidad de fluorescencia de una población uniforme de células, se emplearon las características de moda, media y mediana de esa población para valorar la positividad, puesto que de lo contrario, el valor de porcentaje positivo sería erróneo. También, en este caso, se utilizó la corrección matemática que permite realizar el sistema de "Lysys II" y que consiste en la sustracción de un histograma "fondo" (control) de aquel que es el histograma "test" ("background subtraction") sobre una base canal por canal.

Para el análisis de los antígenos de superficie de membrana se descartaron las células que, en la comparación de su "Forward scatter" con su "Side scatter", correspondían a células muertas. El estudio se realizó:

- 1) sobre la población total cuando interesaba ver el porcentaje de los diferentes grupos de células, lo que permitía también comprobar el grado de purificación de células B leucémicas con las que se han realizado los experimentos.

- 2) sobre una ventana particular, correspondiente a un tipo concreto de células. Fue el caso del estudio, por ejemplo, de la presencia de la cadena ligera lambda o kappa de las inmunoglobulinas, o bien de la expresión del R-IL6 en los linfocitos B leucémicos.

La ventaja del programa "Paint a Gate" sobre el "Lysys II" estriba en la posibilidad del primero de dar el resultado de cada una de las tres fluorescencias en cada célula, cosa imposible con el otro método. Además, es más sencillo colocar los cursores en dicho programa, por la posibilidad de valorar la morfología de la

curva. En cualquier caso, se han utilizado ambos sistemas a la hora de llevar a cabo el análisis de las muestras.

4.1.e. Detección del receptor para hematíes de ratón

Esta determinación se fundamenta en que los linfocitos de la LLC-B tienen en su membrana de superficie, receptores para los hematíes de ratón, lo que constituye un marcador de células B inmaduras. Este hallazgo ha sido considerado por muchos autores como el mejor marcador diagnóstico de la LLC-B (Hokland y col., 1992).

Se ha realizado este estudio en los primeros enfermos de esta serie. Posteriormente se abandonó, al ser suficiente para el diagnóstico correcto de la LLC-B el análisis fenotípico mediante citometría de flujo. Por otra parte, es un procedimiento laborioso y sometido a la subjetividad del ojo humano, al contrario que el análisis fenotípico por citometría de flujo.

Los hematíes frescos de ratón se obtienen por sangrado, previa anestesia con éter, del plexo retro-orbitario de ratones Swis. Se sangran como mínimo tres ratones, y los hematíes se lavan tres veces con suero salino fisiológico, resuspendiéndolos en medio Tc 199 al 1%. Su utilización debe ser inmediata. La técnica se realizó con 3×10^5 linfocitos en un volumen aproximado de 0.1 ml, al que se añadió 0.2 ml de hematíes de ratón al 1% y 0.1 ml de SBF, absorbido previamente con hematíes de ratón. Se centrifugó 5 minutos a 200 g, y a continuación se resuspendió suavemente, sin necesidad de incubación previa. Se añadió una gota de naranja de acridina, leyéndose seguidamente en el microscopio de fluorescencia, y se procedió a calcular el porcentaje de linfocitos aislados y de linfocitos rodeados de hematíes, que son llamados rosetas. Se consideró roseta cuando el linfocito tenía tres o más hematíes adheridos.

4.2. Respuesta proliferativa de las células B leucémicas, estudiada en los cultivos celulares

En este apartado se describe el procedimiento empleado para determinar la función inmunológica básica de los linfocitos B leucémicos, es decir, la respuesta

proliferativa espontánea y tras una variedad de estímulos de los linfocitos B en cultivo.

4.2.a. Cultivo

Las células B leucémicas fueron cultivadas en medio completo a una concentración de 0.5×10^6 ó de 2.5×10^6 células por ml. Se sembraron por duplicado en placas estériles de 96 pocillos, con fondo plano, de forma que quedase al final un volumen de 0.2 ml por pocillo. El tiempo de cultivo fue de 3 y 7 días.

Todos los cultivos celulares realizados se desarrollaron en condiciones de esterilidad, manteniéndose a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

4.2.b. Medida de la respuesta proliferativa estimulada

Todos los mitógenos utilizados se añadieron al principio del cultivo. La concentración adecuada del agente mitógeno varió con cada lote de fabricación, por lo que se utilizó sólo uno, en el que se determinó su concentración óptima sobre cultivos de donantes sanos. Los mitógenos utilizados y las dosis empleadas fueron:

- Fitohemaglutinina (PHA): 10 µg/ml. Es un activador policlonal de la célula T y se empleó como control interno del experimento con el objetivo de detectar posibles células T contaminantes.

- Interleucina 2 recombinante (IL-2): 100 y 10 U/ml.

- Phorbol 12, 13-Dibutyrate (PDB): 25 ng/ml.

- Interleucina 6 recombinante (IL-6).

- Anticuerpo neutralizante frente a la interleucina 6 humana (anti-IL6).

Tanto en el caso de la interleucina 6 recombinante como en el del anticuerpo neutralizante frente a la IL6 humana, se estudió el efecto funcional de un rango amplio de dosis, que oscilaron entre 20 ng/ml a 0.625 pg/ml para la IL-6 y entre 50 µg/ml a 0.5 ng/ml para el anti-IL6.

Se usó ese rango de dosis para la IL-6 partiendo del estudio publicado por Levy y col., 1990. El rango de dosis empleado para el anti-IL6 se hizo según las indicaciones del fabricante, basadas en un estudio de la dosis neutralizante 50 (DN₅₀).

4.2.c. Medida de la respuesta proliferativa espontánea

En la placa de cultivo se incluyeron también pocillos con la suspensión celular y sin mitógeno alguno, con el fin de medir la respuesta de fondo, así como para estudiar la respuesta proliferativa espontánea de las células de la LLC-B.

4.2.d. Cuantificación de la proliferación celular

El método empleado para la cuantificación de la proliferación celular fue el análisis de la incorporación de timidina tritiada (^3HT) al ADN sintetizado *de novo*. Para ello, tras la adición de 1 microcurio de ^3HT a cada pocillo durante las últimas 18 horas, los cultivos se recogieron por aspiración, utilizando un colector de cultivos Skatron, obteniéndose los extractos secos de dichos cultivos. La ^3HT no incorporada al ADN celular se eliminó. Estos extractos secos se distribuyeron en viales de centelleo a los que se añadió 4 ml de líquido de centelleo. Se determinó la emisión de radiación beta en cuentas por minuto (cpm) en un contador beta. La adición de la ^3HT al cultivo se hizo siempre en el mismo periodo de tiempo en todos los experimentos. Los resultados se expresaron como la media aritmética de las determinaciones realizadas en cada caso, siendo la variabilidad de los valores individuales menor del 10% de la media. La inducción de la proliferación se definió como un aumento mayor de dos veces en cpm en comparación con el control no estimulado. La inhibición de la proliferación se definió como una disminución mayor o igual del 50% en cpm en comparación con el control no estimulado.

4.3. Obtención de sobrenadantes de los cultivos de las células B leucémicas y análisis de la IL-6 y del receptor soluble de la IL-6 contenidos en los sobrenadantes

4.3.a. Obtención de los sobrenadantes

Se incubaron 2×10^6 linfocitos B purificados del paciente, a una concentración de 1×10^6 células por mililitro en tubos estériles, en medio completo, que contenía un 10% de SBF. El tiempo de incubación fue de 24 horas, 72 horas, 5

días y 7 días. Las células se incubaron, tanto en situación basal, como añadiendo PDB en los tubos correspondientes a los días 1 y 3, con el objeto de detectar la secreción espontánea de IL6 y compararla con la secreción que existía cuando había en el medio PDB. Tras la incubación, los tubos se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos. Se recogieron los sobrenadantes y fueron congelados a -70°C hasta su utilización.

4.3.b. Análisis de la IL-6 y del receptor soluble de la IL-6

La cuantificación de la concentración de la IL-6 y del receptor soluble de la IL-6 en los sobrenadantes de células en cultivo se realizó mediante un método de ELISA ("QuantikineTM"-R&D Systems).

Análisis de la IL-6

a) Principio:

En una primera incubación, la IL-6 presente en la muestra objeto de estudio se unió al anticuerpo monoclonal murino, específico para la IL-6, y previamente inmovilizado en la superficie de los pocillos de la placa donde se iba a realizar el experimento. En una segunda incubación, se unió a la IL-6 de la muestra un anticuerpo policlonal frente a la IL-6, conjugado con peroxidasa. Para medir la actividad enzimática se usó un cromógeno (tetrametilbencidina) unido a H₂O₂, interrumpiendo la reacción enzimática con ácido sulfúrico. La intensidad cromática se determinó a 450 nm, siendo proporcional a la concentración de IL-6 de la muestra.

b) Reactivos:

Envase "human IL-6 QuantikineTM" de R&D Systems, que incluye: placa de 96 pocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal murino frente a la IL-6; Cuatro láminas autoadhesivas; conjugado IL-6 (anticuerpo policlonal frente a la IL-6, conjugado con peroxidasa de rábano); IL-6 humana recombinante, liofilizada, en un tampón básico de proteínas (1.5 ng); diluyente de ensayo RD1A (tampón de proteínas); diluyente calibrador RD5A (tampón de proteínas, utilizado para reconstituir y diluir la IL-6 humana liofilizada, obteniendo así las diluciones estándares: 300 pg/ml, 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12.5 pg/ml, 6.25 pg/ml, 3.13 pg/ml y 0 pg/ml); concentrado tampón de lavado (solución concentrada de un

surfactante tampón, a partir del cual se obtiene el tampón de lavado, al añadir 480 ml de agua destilada a 20 ml del concentrado de tampón de lavado); reactivo de color A (peróxido de hidrógeno estabilizado) y B (cromógeno tetrametilbencidina estabilizado); solución sustrato (resultante de la mezcla en volúmenes iguales de ambos reactivos de color); ácido sulfúrico 2 Normal.

c) Procedimiento:

Se añadieron a cada uno de los pocillos de la placa, 100 μ l del diluyente de ensayo RD1A y 100 μ l de cada muestra de sobrenadante o de estándar. La placa, cubierta con una lámina autoadhesiva, se incubó a temperatura ambiente durante dos horas. Se aspiró y se efectuaron cuatro lavados con el tampón de lavado. Se añadió a cada pocillo 200 μ l de conjugado de IL-6. La placa se incubó, protegida con otra lámina autoadhesiva, durante dos horas a temperatura ambiente. Se repitió el proceso de aspirado y lavado previo. Se añadieron 200 μ l de la solución sustrato a cada pocillo de la placa y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción enzimática que da origen a la aparición del color con 50 μ l de ácido sulfúrico 2 Normal. La intensidad del color se midió utilizando un espectrofotómetro, realizando la medida con un filtro de 450 nm en los 30 minutos siguientes. Por último, se preparó una curva, enfrentando la densidad óptica con la concentración de IL-6 en los pocillos estándares. Una vez trazada la curva, y partiendo de la densidad óptica de las muestras de los sobrenadantes estudiadas se determinó la concentración de citocina que existía en cada muestra analizada.

Análisis del receptor soluble de la IL-6

El análisis del receptor soluble de la interleucina 6 en los sobrenadantes de las células leucémicas en cultivo se realizó siguiendo el mismo procedimiento cuantitativo descrito, con la salvedad de que se emplearon anticuerpos frente a dicho receptor soluble.

a) Principio:

En la primera incubación, el receptor soluble de la IL-6 presente en la muestra objeto de estudio se unió al anticuerpo monoclonal murino, específico para dicho receptor soluble, y previamente inmovilizado en la superficie de los pocillos de la placa donde se iba a realizar el procedimiento. En la segunda incubación, se unió al receptor soluble de la IL-6 de la muestra un anticuerpo policlonal frente a dicho receptor soluble, conjugado con peroxidasa. Para medir la actividad enzimática se usó un cromógeno (tetrametilbencidina) unido a H_2O_2 ,

interrumpiendo la reacción enzimática con ácido sulfúrico. La intensidad cromática se determinó a 450 nm, siendo proporcional a la concentración del receptor soluble de la IL-6 presente al inicio en la muestra.

b) Reactivos:

Envase "human IL-6sR Quantikine™" de R&D Systems, que incluye: placa de 96 pocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal murino frente al receptor soluble de la IL-6; cuatro láminas autoadhesivas; conjugado IL-6sR (anticuerpo policlonal frente al receptor soluble de la IL-6, conjugado con peroxidasa de rábano); receptor soluble de la IL-6 humana recombinante, liofilizado, en un tampón básico de proteínas (10 ng); Diluyente de Ensayo RD1A (tampón de proteínas); diluyente calibrador RD5C (tampón de proteínas, utilizado para reconstituir y diluir el receptor soluble de la IL-6 humana recombinante, liofilizado, obteniendo de esta forma las diluciones estándares: 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.3 pg/ml y 0 pg/ml); concentrado tampón de lavado (solución concentrada de un surfactante tampón, a partir del cual se obtiene el tampón de lavado, al añadir 480 ml de agua destilada a 20 ml del concentrado tampón de lavado); reactivo de color A (peróxido de hidrógeno estabilizado) y B (el cromógeno tetrametilbencidina estabilizado); solución sustrato (resultante de la mezcla en volúmenes iguales de ambos reactivos de color); ácido sulfúrico 2 Normal.

c) Procedimiento:

Se añadieron, a cada uno de los pocillos de la placa, 100 µl del diluyente de ensayo RD1A y 100 µl de cada muestra de sobrenadante o de estándar. La placa, cubierta con una lámina autoadhesiva, se incubó a temperatura ambiente durante dos horas. Se aspiró y se efectuaron tres lavados con el tampón de lavado. Se añadió a cada pocillo 200 µl de conjugado IL-6sR. Se incubó, protegida la placa con otra lámina autoadhesiva, durante dos horas a temperatura ambiente. Se repitió el proceso de aspirado y lavado previo. Se añadieron 200 µl de la solución sustrato a cada pocillo de la placa y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción enzimática que da origen a la aparición del color con 50 µl de ácido sulfúrico 2 Normal. Se midió la intensidad del color utilizando un espectrofotómetro, realizando la medida con un filtro de 450 nm en los 30 minutos siguientes. Por último, se preparó una curva, enfrentando la densidad óptica con la concentración del receptor soluble de la IL-6 en los pocillos estándares, y se determinó la concentración del receptor soluble de la citocina que existía en cada muestra analizada.

4.4. Determinación de la concentración de la IL-6 y del receptor soluble de la IL-6 en el suero de los pacientes

Ambas determinaciones se realizaron siguiendo los pasos desarrollados en el apartado anterior, salvo en los siguientes puntos:

a) En el estudio de la IL-6, la dilución de los estándares se llevó a cabo con el diluyente calibrador RD6F (constituido por suero animal con preservante) y no con el RD5A, empleado en el caso de las muestras de sobrenadantes.

b) En el análisis del receptor soluble de la IL-6 en las muestras de suero, se hicieron diluciones de esas muestras al 1:40 con el diluyente calibrador RD5C.

4.5. Estudio de la diferenciación del linfocito B leucémico bajo el estímulo de la IL-6

La finalidad de este experimento era comprobar si la IL-6 es capaz de inducir la diferenciación del linfocito B leucémico hacia célula plasmática productora de *inmunoglobulinas*, como lo hace en linfocitos B normales. Para ello se determinó la capacidad de síntesis de *inmunoglobulinas* de los linfocitos B de las muestras purificadas, cuando se les ponía en contacto con la IL-6. Además, se llevó a cabo un estudio fenotípico de dichas células al finalizar el tiempo de cultivo establecido.

4.5.a. Producción de *inmunoglobulinas in vitro* bajo el estímulo de la IL-6

a) Cultivo:

Se determinó *in vitro* la capacidad de síntesis de *inmunoglobulinas*, cultivando 10^5 linfocitos B purificados por pocillo en medio completo, tanto en situación basal, como en contacto con diversas dosis de IL-6, que oscilaron entre 20 ng/ml y 0.625 pg/ml. El cultivo celular se mantuvo 7 días en estufa a 37°C y 5% de CO₂.

b) Cuantificación de las inmunoglobulinas:

La cuantificación de las inmunoglobulinas contenidas en los sobrenadantes se realizó por un método de ELISA. En este procedimiento, un primer anticuerpo se pegó a las superficies de los pocillos de las placas y después de bloquear los lugares no unidos a éste, los sobrenadantes se incubaron en pocillos separados, permitiendo así a la inmunoglobulina de interés unirse al primer anticuerpo. Los componentes de los sobrenadantes no unidos a la inmunoglobulina se removieron lavando, y se añadió un segundo anticuerpo, conjugado con una peroxidasa, dirigido frente a la inmunoglobulina de interés. El exceso del conjugado se eliminó, lavando nuevamente, y se añadió solución sustrato a cada pocillo. La cantidad de color que apareció por la interacción del conjugado enzimático con el sustrato fue directamente proporcional a la cantidad de inmunoglobulina presente en el sobrenadante. Se realizaron tres procedimientos de ELISA de forma simultánea, para la medición cuantitativa de las inmunoglobulinas IgM, IgA e IgG.

Los pasos de la técnica de ELISA empleada fueron los siguientes:

1) Las placas de ELISA se recubrieron con 200 μ l/pocillo de una dilución 1:1000 de anticuerpos anti IgM, anti IgA o anti IgG humanas. Se incubaron 18 horas en cámara húmeda a 4°C. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.05%.

2) Se añadió 200 μ l/pocillo de ocho diluciones consecutivas al 1/2 de un control con cantidad de inmunoglobulina conocida. Los sobrenadantes a analizar se diluyeron al 1/10 y 1/100 y se depositaron 200 μ l por pocillo. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente y se lavó tres veces con PBS Tween 0.05%.

3) Se añadió 200 μ l/pocillo de una dilución 1/2000 de anticuerpo anti IgM, anti IgA o anti IgG conjugado con peroxidasa. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente y se lavó cinco veces.

4) Se añadió 200 μ l/pocillo del sustrato formado por un cromógeno: clorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) diluido (10 μ g por cada 25 ml de tampón citrato). Tras aproximadamente dos minutos, se interrumpió la reacción enzimática con ácido sulfúrico 4 Normal. Después se leyó en el espectrofotómetro a 492 nm. Con las ocho diluciones del control conocido se estableció una recta en la que se interpolaron los valores hallados de los sobrenadantes problemas.

4.5.b. Estudio fenotípico de los linfocitos B en contacto con la IL-6 en el medio de cultivo

Al diferenciarse el linfocito B a célula plasmática productora de inmunoglobulinas se produce un cambio en la expresión de los diferentes antígenos de superficie, que lo caracterizan. El objetivo de este experimento fue comprobar si los linfocitos B de las muestras purificadas y mantenidas en cultivo con IL-6 durante siete días, mostraban un cambio en el fenotipo celular, con desaparición de los antígenos de superficie de membrana que se expresan en los linfocitos B maduros pero no en las células plasmáticas. Para ello se siguió el siguiente procedimiento:

Cultivo

Las células B leucémicas fueron cultivadas en medio completo a una concentración de 1×10^6 células por ml. Se sembraron por duplicado en placas estériles de 24 pocillos, con fondo plano, de forma que quedase al final un volumen de 2 ml por pocillo. El tiempo de cultivo fue de 7 días.

El día 0 se añadió al cultivo interleucina 6 recombinante (IL-6) a una concentración de 1 ng/ml. En la placa de cultivo se incluyeron también pocillos con la suspensión celular y sin IL-6, con el fin de poder comparar el estudio fenotípico de estas células con las que habían estado en contacto con la citocina.

Todos los cultivos celulares realizados se desarrollaron en condiciones de esterilidad, manteniéndose a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

Caracterización fenotípica de los linfocitos B de la LLC-B en cultivo

Después de permanecer los linfocitos B en cultivo 7 días, se procedió al análisis fenotípico de dichas células mediante citometría de flujo.

Se recogió el medio de cultivo que contenía las células objeto del estudio con una pipeta Pasteur, y se incorporó a un tubo de centrifuga de 10 ml estéril. Se lavó el pocillo de la placa de cultivo suavemente con RPMI completo y se añadió el resultado de este lavado al tubo de centrifuga. Posteriormente se realizaron dos lavados como se ha detallado en el apartado 2.1.. Se resuspendieron las células en

medio completo y se practicó el contaje, al tiempo que se analizó la viabilidad celular, mediante el empleo del azul tripán.

La combinación de anticuerpos monoclonales frente a antígenos de superficie de membrana estudiados fue la siguiente:

- CD5, CD19, CD20: Las células de la LLC-B, que son triplemente positivas para esta combinación de anticuerpos, dejan de expresar dichos antígenos de superficie al diferenciarse y transformarse en células plasmáticas.

- anticuerpo anti- λ , anti- κ , CD19: De igual forma se empleó esta combinación de anticuerpos monoclonales. Al transformarse el linfocito B en célula plasmática deja de expresar el antígeno CD19, así como también las inmunoglobulinas monoclonales en la superficie celular, que pasan a ser intracitoplasmáticas.

El procesamiento de las muestras para su análisis se realizó por la técnica de inmunofluorescencia directa, como se describe previamente en el apartado 3.1.b. En esta ocasión también se realizaron los controles de autofluorescencia e isotipo, ya detallados en el apartado 3.1.c., así como la determinación de la viabilidad celular mediante citometría de flujo. La adquisición de las muestras y el análisis en el citómetro de flujo se llevó a cabo según se ha explicado en el apartado 3.1.c.

4.6. Análisis del receptor de la IL-6 en la membrana de las células B en cultivo y de los antígenos de activación CD25 y CD71

En este experimento se valoró la variación en la expresión del receptor de la citocina en la membrana de superficie de los linfocitos B leucémicos tras uno, tres, cinco y siete días en cultivo. Para ello se siguió el siguiente procedimiento:

4.6.a. Cultivo

Las células B leucémicas fueron cultivadas en medio completo a una concentración de 1×10^6 células por ml. Se sembraron por triplicado en placas estériles de 24 pocillos, con fondo plano, de forma que quedase al final un volumen de 2 ml por pocillo. El tiempo de cultivo fue de uno, tres, cinco y siete días.

Todos los cultivos celulares realizados se desarrollaron en condiciones de esterilidad, manteniéndose a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

4.6.b. Adición de mitógenos al cultivo de células B

Se añadieron al medio completo los siguientes mitógenos:

- Un activador policlonal de los linfocitos B: la cepa Cowan 2 del *Staphylococcus aureus* (SAC₂). Se emplearon 200 µl de SAC₂, a una dilución de 1:1000, para un volumen total de 2 ml de cada pocillo de la placa. Previamente al uso del SAC₂ se había probado su acción a diferentes diluciones (realizadas con medio completo), frente a una población purificada de linfocitos B de una persona sana, siendo la dilución 1:1000 la que resultó ser más eficaz como activador de esas células. La respuesta celular a las diferentes diluciones de SAC₂ se estudió mediante la medición de la incorporación de timidina tritiada a los linfocitos B en cultivo.

- Interleucina 2 recombinante (IL-2): Se usó a la concentración de 100 U/ml.

- Phorbol 12, 13-Dibutyrate (PDB): Se empleó a la concentración de 25 ng/ml.

- Interleucina 6 recombinante (IL-6): Se añadió a una concentración de 1 ng/ml.

En la placa de cultivo se incluyeron también pocillos con la suspensión celular y sin mitógeno alguno, con el fin de medir la expresión del receptor de la IL-6 a lo largo de los diferentes días de cultivo, y poder compararla con los hallazgos de dicho receptor en la membrana de las células que habían estado en contacto con los mitógenos empleados.

4.6.c. Estudio del receptor de la IL-6 en la membrana de los linfocitos B de la LLC-B en cultivo y de los antígenos CD25 y CD71

Después de permanecer las células en cultivo los días determinados con anterioridad, se procedió al análisis del receptor de la IL-6 en la membrana de superficie de las células B leucémicas mediante citometría de flujo. También se estudió la presencia de los antígenos CD25 y CD71 en dichas células.

Se recogió el medio de cultivo que contenía las células objeto del estudio con una pipeta Pasteur, y se incorporó a un tubo de centrifuga de 10 ml estéril. Se lavó el pocillo de la placa de cultivo suavemente con RPMI completo y se añadió el resultado de este lavado al tubo de centrifuga. Posteriormente se realizaron dos lavados como se ha detallado en el apartado 2.1.. Se resuspendieron las células en medio completo y se practicó el conteo, al tiempo que se analizó la viabilidad celular, mediante el empleo del azul tripán.

La combinación de anticuerpos monoclonales frente a antígenos de superficie de membrana estudiados fue la siguiente:

- CD5, IL-6, CD19: Se utilizó de nuevo un método indirecto de medida de la expresión del receptor de la IL-6, pues lo que se analizó es la presencia de la citocina, conjugada con PE, en la superficie celular.

- CD25, CD71, CD19: Con esta combinación de anticuerpos monoclonales se valoró la expresión de la cadena alfa del receptor de la interleucina 2 (CD25) y el porcentaje de las células en proliferación (CD71); todo ello sobre células B (CD19).

- CD45, CD14, CD3: Sirvió para valorar el porcentaje de monocitos (CD14) y de linfocitos T (CD3) presentes en la muestra estudiada.

El procesamiento de las muestras para su análisis se realizó por la técnica de inmunofluorescencia directa, como se describe previamente en el apartado 3.1.b. En esta ocasión también se realizaron los controles de autofluorescencia e isotipo, ya detallados en el apartado 3.1.c., así como la determinación de la viabilidad celular mediante citometría de flujo. La adquisición de las muestras y el análisis en el citómetro de flujo se llevó a cabo según se ha explicado en el apartado 3.1.c.

4.7. Estudio del ciclo celular de los linfocitos B de la LLC-B en cultivo

Este experimento se realizó para estudiar el porcentaje de células leucémicas en las diferentes fases del ciclo celular, tras 3 y 7 días en cultivo, y en contacto con diferentes agentes mitógenos. El procedimiento constó de las siguientes etapas:

4.7.a. Cultivo

Las células B leucémicas se cultivaron en medio completo a una concentración de 1×10^6 células por ml. Se sembraron por duplicado en placas estériles de 24 pocillos, con fondo plano, de forma que quedase al final un volumen de 2 ml por pocillo. El tiempo de cultivo fue de 3 y 7 días.

Todos los cultivos celulares realizados se desarrollaron en condiciones de esterilidad, manteniéndose a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

4.7.b. Adición de mitógenos al cultivo de células B

Los mitógenos que se añadieron al cultivo, el día cero, fueron:

- Interleucina 2 recombinante (IL-2): Se usó a la concentración de 100 U/ml.
- Phorbol 12, 13-Dibutyrate (PDB): Se empleó a la concentración de 25 ng/ml. Se utilizó tanto de forma aislada como en combinación con la IL-6 y con la IL-2.
- Interleucina 6 recombinante (IL-6): Se añadió en el estudio de las muestras de linfocitos B a una concentración de 1 ng/ml.
- La cepa Cowan 2 del *Staphylococcus aureus* (SAC₂): Se adicionó de la forma detallada en el apartado 3.6.
- Fitohemaglutinina (PHA): Se empleó a la dosis de 10 µg/ml.

En la placa de cultivo se incluyeron también pocillos con la suspensión celular y sin mitógeno alguno, con el fin de medir la respuesta de fondo, así como para estudiar la respuesta proliferativa espontánea de las células de la LLC-B.

4.7.c. Obtención y preparación de las muestras para el análisis del ciclo celular

Se recogió el medio de cultivo que contenía las células objeto del estudio y se incorporó a un tubo de centrifuga. Se lavó el pocillo de la placa de cultivo suavemente con RPMI completo y se añadió el resultado de este lavado al mismo tubo. Se realizaron dos lavados, de la misma forma que se ha detallado en apartados anteriores, y se resuspendieron las células en medio completo, practicándose el conteo y analizándose la viabilidad celular.

Se distribuyeron las células en los diversos tubos de análisis del citómetro, añadiéndose a cada uno 1 ml de etanol por cada 4×10^6 de células. Después de una incubación de 15 minutos a 4°C se hizo un lavado con 4 ml de RPMI (diez minutos a 400 g y a 4°C). Posteriormente se decantó y se añadió ioduro de propidio (IP), en una cantidad igual a la mitad de la empleada con el etanol. Se esperó un mínimo de 20 minutos (tiempo en el que las muestras estuvieron protegidas de la luz) y se procedió al análisis de las muestras mediante el programa "Cell fit" del citómetro de flujo.

4.7.d. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo (Programa "Cell fit")

En el citómetro de flujo, el detector FL-2 midió la intensidad de la fluorescencia naranja-rojo. El IP es una sustancia naranja-rojo que se une a los ácidos nucleicos de doble cadena; esta unión se puede cuantificar mediante el detector FL-2. La cantidad de fluorescencia es proporcional al contenido de ADN de la célula. Hay dos parámetros adicionales que proporciona el DDM ("Doublet Discrimination Module"), y que permiten distinguir dos células juntas (dobletes) de células simples. Estos parámetros son: FL2-área (FL2-A) y FL2-anchura (FL2-W, del inglés "width"). Por ejemplo, se empleó un "dot-plot" con FL2-W y FL2-A para distinguir dos células antes de la síntesis de ADN (células en fase G_0/G_1) de una célula tras la síntesis de ADN (células en fase G_2/M). En la mayoría de los casos, FL2-A da una medida mejor de la fluorescencia del IP. Puesto que la emisión de fluorescencia del IP entra en el campo del detector FL-3, no se empleó este detector en el estudio.

El programa "Cell fit" no puede distinguir entre las fases G_0/G_1 , con el estudio de la intensidad de fluorescencia y, también las células en fase G_2 y M aparecen como una única población.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos cuantitativos de este estudio se presentan de forma resumida con la media, desviación típica (DS), tamaño de la muestra, rango y, en ocasiones, la mediana.

Previamente a los cálculos estadísticos se contrastaron las hipótesis de normalidad con el test de Kolmogorov y de homogeneidad de varianzas con el test de Barlett. La aceptación o rechazo de las hipótesis anteriores ayudaron a utilizar contrastes paramétricos o no paramétricos respectivamente.

Análisis intragrupos

Para comparar las medias de los índices de proliferación según el cambio de las dosis (situación basal y diferentes dosis utilizadas de IL-6 y Anti-IL6) y en aquellas variables que seguían distribuciones normales, se realizó un ANOVA (Análisis de varianza) para medidas repetidas, seguido por el test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

En aquellas muestras en las que se rechaza la hipótesis de normalidad, las respuestas a los cambios de dosis, se realizaron mediante un ANOVA no paramétrico (contraste de Friedman), y las comparaciones individuales mediante el test de rangos de Wilcoxon para datos apareados.

Análisis intergrupos

Se utilizó el contraste t de Student para comparar los grupos, cuando las variables cuantitativas cumplían las hipótesis establecidas. Si esto no ocurría, las muestras se compararon mediante el contraste no paramétrico U de Mann-Whitney para muestras independientes.

El ANOVA de Kruskal-Wallis es el test no paramétrico utilizado cuando se contrastaban más de dos muestras y no se cumplían las hipótesis establecidas.

Para todos los contrastes estadísticos se han considerado niveles de significación inferiores a 0.05 en contraste bilateral.

El análisis estadístico fue realizado en el departamento de Bioestadística de la Clínica Puerta de Hierro. Los datos fueron procesados mediante un ordenador Micro-Vax II con programas elaborados en la Sección de Bioestadística

RESULTADOS

1. ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Después de obtener las células mononucleadas de sangre periférica (CMSP), procedentes de muestras de sangre de pacientes con LLC-B, se realizó un análisis de los antígenos de superficie de membrana mediante citometría de flujo. De esta forma se consiguió diferenciar las siguientes poblaciones celulares:

1.1. Población de linfocitos T

En todas las muestras, excepto en una -paciente número 17 de la serie- se analizó la expresión del antígeno de superficie de membrana CD3 (Pan T) en las CMSP. El porcentaje de células T presentes en cada muestra osciló entre el 0.5% y el 51.0% (media \pm D.S.: 15.1% \pm 13.6). Diecinueve pacientes (50.0%) tenían menos de un 10% de linfocitos T en sangre periférica; trece (34.2%) entre un 10-20%; y en seis de los pacientes (15.8%) el porcentaje de células mononucleadas, que en sangre periférica expresaban el antígeno CD3, era superior o igual al 30% (Tablas 6 y 8).

En veintiséis pacientes se estudió además la expresión de los antígenos de superficie de membrana CD4 y CD8, por parte de los linfocitos T de sangre periférica, que osciló en el caso del antígeno CD4 entre el 0.4 y el 33.0% (media \pm D.S.: 9.4% \pm 8.3), y en el CD8 entre el 0.1% y el 17.0% (media \pm D.S.: 5.0% \pm 3.6). En el análisis realizado, sólo un paciente mostraba el cociente CD4/CD8 inferior a uno; en el resto -veinticinco pacientes- el valor del cociente era superior a uno. No se observó la presencia de células de la estirpe linfocitaria T que expresaran, de forma conjunta en su superficie, los antígenos CD4 y CD8 (Tablas 6 y 8). Las poblaciones positiva y negativa para cada uno de estos antígenos estaban claramente diferenciadas entre sí.

TABLA 6. FENOTIPO DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGRE PERIFÉRICA EN CADA PACIENTE

Pac.	CD3	CD4	CD8	CD14	CD16	CD56	CD19	CD20	CD5	HLA-DR	κ/λ
1	9*	6	3	1	-	0	92	64	99	97	λ
2	2	-	-	0	0	-	95	51	98	98	κ
3	2	-	-	2	0	0	67	55	-	94	-
4	0.5	0.4	0.1	0	0	0	99	60	99	99	λ
5	7	4	3	3	-	1	89	54	96	92	κ
6	2	-	-	3	2	2	96	90	-	95	-
7	10	6	4	5	2	1	84	83	94	86	λ
8	10	6	4	1	3	3	85	51	95	85	κ
9	14	9	5	1	-	1	83	56	70	84	κ
10	13	7	6	1	2	0	86	17	92	88	κ
11	45	-	-	16	13	13	67	37	71	60	-
12	35	-	-	0	2	2	64	37	89	63	-
13	7	4	3	0	0	0.5	91	62	97	91	λ
14	3	2	1	0.5	0	0	96	32	98	97	κ
15	17	12	5	4	6	2	77	76	71	78	κ
16	8	5	3	0	0	0	90	68	98	82	κ
17	-	-	-	-	13	-	-	-	-	-	-
18	19	14	5	3	2	1	79	29	92	67	κ
19	1	-	-	0	0	0	37	44	65	94	-
20	23	12	10	4	-	0	71	23	94	67	κ
21	6	4	2	2	-	0.5	92	83	98	94	κ
22	9	5	4	0.5	3	2	89	-	97	86	λ
23	13	-	-	1	7	5	85	51	82	83	-
24	30	25	5	6	-	1	62	10	87	70	κ
25	51	-	-	13	20	8	13	10	38	41	-
26	3	2	1	0.5	1	2	94	58	96	92	κ
27	5	3	2	1	1	0	93	40	96	94	κ
28	15	-	-	3	5	-	87	-	68	88	-
29	39	29	10	4	-	2	55	-	-	51	κ
30	19	-	-	1	4	-	83	30	92	81	-
31	2	-	-	0	0	0	98	-	97	97	-
32	20	10.5	9.5	7	-	-	70	-	81	-	λ
33	22	12	10	1	-	0	74	30	96	74	κ
34	8	5	3	3.5	-	-	85	58	-	-	λ
35	6	3.5	2.5	0	-	0	92	65	91	94	κ
36	23	16	7	4	-	8	66	58	89	71	-
37	50	33	17	13	-	16	22	21	70	40	λ
38	4	1	3	3	-	1	93	89	97	92	κ
39	23	17	6	8	-	3	66	-	90	74	κ

* Los valores representan porcentajes de positividad, excepto la expresión de la cadena ligera de la inmunoglobulina κ o λ.

1.2. Población de células "natural killer"

En treinta y tres pacientes se empleó un anticuerpo monoclonal frente al antígeno de superficie de membrana CD56, que caracteriza la población de células "natural killer" (NK). Sólo dos de esos pacientes tenían un porcentaje superior al 10% e inferior al 20% (13% y 16%) de células NK entre las CMSP. El resto de las muestras presentaba un porcentaje de células NK comprendido entre el 0 y 9% (media \pm D.S.: 2.3% \pm 3.7) (Tablas 6 y 8).

En las fases iniciales del estudio se utilizó también, en veinticuatro pacientes, un anticuerpo monoclonal frente al antígeno de superficie CD16 -expresado por las células NK y por una proporción de linfocitos T-. El porcentaje de células positivas para dicho antígeno osciló entre el 0 y el 20% (media \pm D.S.: 3.7% \pm 5.0). En cuatro de las muestras anteriores no se había analizado la expresión del antígeno CD56; tres tenían un porcentaje inferior al 5% de células CD16 (+) entre las CMSP y uno tenía un 13% (Tablas 6 y 8). No se estudió la coexpresión de los antígenos de superficie de membrana CD56, CD16 y CD8, que identifican subpoblaciones fenotípicas de células NK.

1.3. Población de monocitos

En todos los pacientes, excepto en uno -paciente número 17 de la serie- se analizó la expresión del antígeno de superficie de membrana CD14, que caracteriza a los monocitos, que osciló entre el 0 y el 16% (media \pm D.S.: 3.0% \pm 3.8). Treinta y dos pacientes (84%) tenían un porcentaje inferior o igual al 5% de monocitos entre las CMSP; tres tenían entre el 5 y el 10%; y otros tres pacientes tenían un porcentaje superior al 10% de monocitos (13%, 13%, 16%) (Tablas 6 y 8).

TABLA 7. FENOTIPO DE LAS CÉLULAS B LEUCÉMICAS TRAS SU PURIFICACIÓN EN CADA PACIENTE

Pac.	CD3	CD14	CD16	CD56	CD19	CD20	CD5	HLA-DR	CD25
1	0*	0	-	0	98	47	99	95	70
2	0	0	-	0	99	64	99	99	-
3	0	5	0	0	87	81	-	85	-
4	0	0	1	0	99	52	99	99	-
5	1	4	0	0	94	74	95	99	0
6	0	1	1	0	92	84	-	95	-
7	0	3	2	0	98	84	98	98	90
8	0	1	-	1	98	87	98	99	93
9	0.5	0.5	1	0	99	82	51	99	0
10	0	1	2	0	99	59	95	98	70
11	18**	17	12	5	55	50	33	53	-
12	1	0	0	0	79	35	82	85	-
13	0	0	1	0	99	72	99	99	10
14	3	1	-	1	96	32	98	97	-
15	1	1	-	0	94	94	82	97	-
16	0	0	0	0	99	73	99	100	65
17	5	0	-	2	95	26	63	97	-
18	0	0	2	0	94	83	94	100	70
19	1	0	0	0.5	97	44	56	93	-
20	0.5	1	-	0	91	72	90	88	45
21	0	0	3	0	99	84	99	99	68
22	0	3	1	0	98	96	95	98	80
23	2	5	4	4	90	81	70	94	-
24	0	21	8	4	77	83	22	89	65
25	3	30	11	6	60	33	13	84	-
26	0	1	1	1	99	65	96	93	35
27	0.5	1	1	0	98	70	93	99	70
28	15**	3	3	-	87	-	68	88	-
29	49**	3	5	0	64	45	43	63	2
30	19**	1	4	-	83	30	92	81	-
31	0	0	0	-	98	-	98	98	-
32	3	10	-	-	87	84	82	68	-
33	1	1	-	0	98	48	98	98	-
34	3	6.5	-	0	90	31	90	90	-
35	1	1	-	0	98	78	98	99	20
36	2	3.5	-	3	92	82	91	95	95
37	2	32	-	12	42	40	44	82	55
38	0	4	-	0	96	95	96	100	60
39	3	17	-	1	79	75	82	96	15

* Los valores representan porcentajes de positividad.

** Muestras en las que no se realizó purificación con hematíes de oveja.

TABLA 8. FENOTIPO DE LAS CMSP Y DE LA POBLACIÓN B PURIFICADA

Antígenos de membrana	CMSP	Población B purificada
CD3	15.1% ± 13.6* (0.5% - 51%)	3.4% ± 8.7 (0 - 49%)
CD4	9.4% ± 8.3 (0.4% - 33%)	-
CD8	5.0% ± 3.6 (0.1% - 17%)	-
CD14	3.0% ± 3.8 (0 - 16%)	4.6% ± 7.9 (0 - 32%)
CD56	2.3% ± 3.7 (0 - 16%)	1.2% ± 2.5 (0 - 12%)
CD16	3.7% ± 5.0 (0 - 20%)	2.7% ± 3.3 (0 - 12%)
CD19	78.1% ± 19.7 (13% - 99%)	89.7% ± 13.3 (42% - 99%)
CD20	49.7% ± 21.7 (10% - 91%)	65.6% ± 21.4 (26% - 95%)
CD5	87.7% ± 13.4 (38% - 99%)	81.1% ± 23.7 (13% - 99%)
HLA DR	81.6% ± 15.6 (40% - 99%)	92.0% ± 10.5 (53% - 100%)
CD25	-	51.3% ± 30.9 (0 - 95%)
Rosetas con hematíes de ratón	-	83.9% ± 11.3 (60% - 97%)

* Media ± D.S. (rango).

1.4. Población de linfocitos B

Expresión de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas

En veintisiete pacientes se analizó la expresión, en la superficie de la membrana de los linfocitos, de la cadena ligera de la inmunoglobulina kappa (κ) o lambda (λ), mediante anticuerpos monoclonales específicos. Diecinueve pacientes (70%) expresaban la cadena κ , mientras que los ocho restantes (30%) expresaban la cadena ligera λ (Tablas 6 y 8).

Ningún paciente tenía una doble población de linfocitos B, es decir, de linfocitos que expresaran la cadena κ junto con linfocitos que expresaran la cadena λ . Las únicas células que expresaban esos antígenos de superficie eran los linfocitos B, como se demuestra por la coexpresión del antígeno CD19 (Tabla 9).

Expresión de los antígenos CD19, CD20, CD5 y HLA DR

El linfocito B leucémico coexpresa los antígenos de superficie de membrana CD19, CD5 y HLA DR. En la Tabla 5 se detalla, de forma individualizada, la expresión de esos antígenos y no su coexpresión, oscilando entre el 38% y 99% (media \pm D.S.: 87.7% \pm 13.4) para el CD5; entre el 13% y el 99% para el CD19 (media \pm D.S.: 78.1% \pm 19.7); y entre el 40% y el 99% para el HLA DR (media \pm D.S.: 81.6% \pm 15.6). Por último, el linfocito B leucémico expresa el antígeno CD20 en la superficie de membrana, oscilando el porcentaje de células positivas entre el 10% y el 91% (media \pm D.S.: 49.7% \pm 21.7). En todas las muestras estudiadas, las células CD19 (+) expresaban también los antígenos CD5, HLA DR y CD20, al realizar el análisis mediante una técnica de triple marcaje (Tablas 6, 8 y 9).

El análisis de la expresión de los antígenos CD5, CD19 y HLA DR no planteó problema, por existir una buena discriminación entre la población positiva y negativa. No ocurrió lo mismo al estudiar la expresión del antígeno CD20 en las células B leucémicas, donde se objetivó una población celular uniforme que no presentó una buena discriminación frente al valor elegido como negativo, por su baja densidad antigénica en la superficie de la membrana de los linfocitos B. Por eso, como se ha detallado en el apartado de Pacientes, Material y Métodos, se

TABLA 9. FENOTIPO DE LAS CÉLULAS B LEUCÉMICAS: ANÁLISIS POR TRIPLE MARCAJE. PORCENTAJE DE EXPRESIÓN

Paciente	CD19+ CD5+ HLA DR+	CD19+ CD20+ CD5+	λ +/- κ +/ CD19+	CD19+ R-IL6+ CD5+	CD71- CD25+ CD19+
1	99.8	98.0	97.0	93.0	75.0
2	99.9	98.2	99.9	96.0	-
3	98.2	96.2	-	-	-
4	99.1	98.6	99.7	99.0	-
5	99.9	99.9	99.9	99.0	0
6	97.9	96.3	-	-	-
7	95.5	87.6	85.5	91.4	99.0
8	94.7	96.2	98.5	99.0	99.0
9	97.9	100	99.0	92.4	0
10	96.6	94.0	99.0	95.0	99.0
11	98.6	95.5	-	-	-
12	98.7	98.2	-	-	-
13	98.7	98.0	98.6	90.0	10.0
14	99.0	92.0	99.0	94.9	-
15	99.0	99.0	99.0	99.0	-
16	98.7	97.0	98.0	82.0	98.9
17	99.0	99.1	-	-	-
18	100	99.3	99.9	95.0	99.9
19	99.5	99.4	-	-	-
20	98.0	100	100	98.0	100
21	99.9	98.9	99.9	97.0	99.9
22	95.5	90.2	99.0	96.0	99.8
23	97.9	98.0	-	-	-
24	99.8	88.9	99.8	98.3	99.6
25	98.9	96.9	-	-	-
26	96.7	98.7	98.7	90.3	99.9
27	98.0	98.0	100	95.2	99.0
28	98.7	-	-	-	-
29	91.4	99.2	99.2	95.2	98.1
30	100	98.9	-	-	-
31	99.5	-	-	87.0	-
32	96.9	98.7	96.2	91.2	-
33	89.0	99.8	99.9	91.5	-
34	99.3	99.4	98.0	99.3	-
35	99.0	99.2	99.9	98.9	99.4
36	90.1	90.0	-	-	99.9
37	95.3	94.2	100	93.9	98.8
38	99.8	99.7	99.7	83.2	99.7
39	99.8	58.1	96.9	83.1	83.6
Total n=32	97.8 ± 2.6* (90.1 - 100)	95.9 ± 7.1 (58.1 - 100)	98.5 ± 3.0 (85.5 - 100)	93.7 ± 5.0 (82.0- 99.3)	83.7 ± 33.4 (0 - 100)

* Media ± D.S. (rango)

ha utilizado un procedimiento matemático -facilitado por el programa Lysys II del citómetro de flujo- que, mediante sustracción de histogramas, permite el cálculo aproximado de las células analizadas que expresan el antígeno de superficie de membrana CD20.

Determinación de los receptores para los hematíes de ratón

En diez pacientes de la serie se analizó la presencia de receptores para hematíes de ratón en las células B purificadas, oscilando los resultados entre el 60% y el 97% (media \pm D.S.: 83.9% \pm 11.3).

2. ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO DE LA POBLACIÓN DE LINFOCITOS B PURIFICADA

Después de la eliminación de las células T de las CMSP (realización de una selección negativa con hematíes de carnero tratados con AET), se ha realizado un análisis fenotípico mediante citometría de flujo, con el fin de valorar el grado de purificación de las muestras.

2.1. Población de linfocitos T, monocitos y células NK

Cuatro muestras tenían un porcentaje de linfocitos T superior al 5% (15%, 18%, 19%, 49%) en la población celular purificada, mientras que en las treinta y cinco muestras restantes el porcentaje de células T fue inferior al 5% (Tablas 7 y 8).

Siete muestras tenían un porcentaje de monocitos superior al 5% (6.5%, 10%, 17%, 17%, 21%, 30%, 32%) en la población celular purificada. En las treinta y dos muestras restantes el porcentaje de monocitos fue inferior al 5% (Tablas 7 y 8).

Respecto a las células NK, dos muestras tenían un porcentaje superior al 5% (6%, 12%), a juzgar por la expresión del antígeno de membrana de superficie CD56. En el resto de las treinta y tres muestras estudiadas, el porcentaje de positividad fue igual o inferior al 5% (Tablas 7 y 8).

2.2. Población de linfocitos B

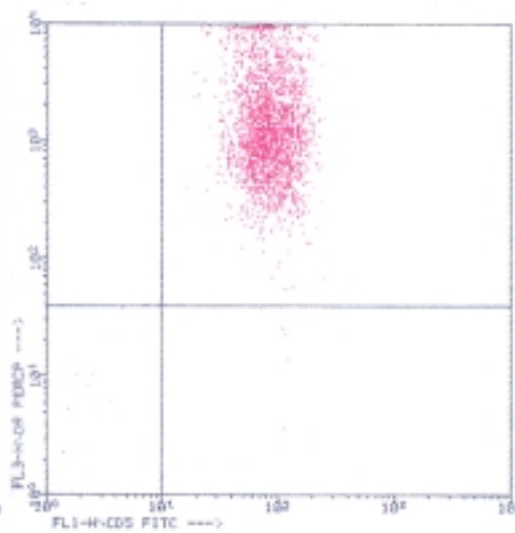
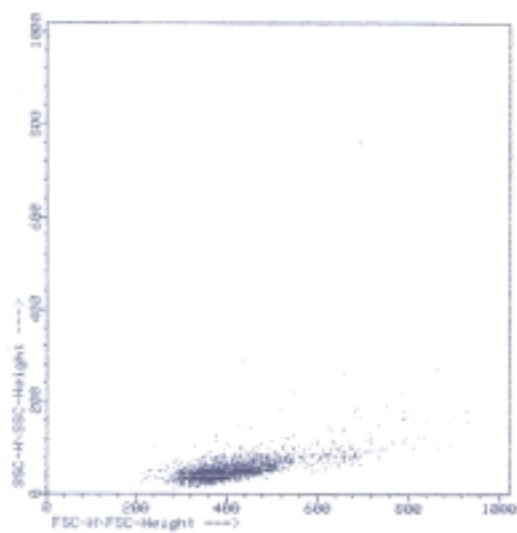
Las células B estudiadas son linfocitos B leucémicos, que expresan al mismo tiempo los antígenos de membrana CD5, CD19, CD20, HLA DR y la cadena ligera κ o λ de la inmunoglobulina. Esta coexpresión antigénica viene reflejada en la tabla 8 y se demostró mediante una técnica de triple marcaje (Figuras 2, 3, 4 y 5).

En conjunto, el porcentaje de células B de las muestras celulares, obtenidas tras la técnica de selección negativa con hematíes de carnero tratados con AET, osciló entre el 85.5% y el 100% (media \pm D.S.: 98.5% \pm 3.0). Treinta de las treinta y nueve muestras estudiadas tenían un porcentaje igual o superior al 95% (Tabla 9). Esta es la población celular con la que se ha desarrollado el resto del trabajo experimental.

Porcentaje de expresión antigénica

El porcentaje de expresión de los antígenos CD5, CD19 y HLA DR en las células leucémicas fue paralelo. El porcentaje de células positivas para el antígeno CD5 osciló entre el 13% y el 99% (media \pm D.S.: 81.1% \pm 23.7); para el CD19 entre el 42% y el 99% (media \pm D.S.: 89.7% \pm 13.3), y en el caso del HLA DR estuvieron comprendidas entre el 53% y el 100% (media \pm D.S.: 92.0% \pm 10.5). Por último, la expresión del CD20 varió entre el 26% y el 95% (media \pm D.S.: 65.6% \pm 21.4). Todos estos valores se obtuvieron mediante el programa de análisis "Lysys II" del citómetro de flujo (Tablas 7 y 8).

FIGURA 2. Análisis por "Lysys II" de la población leucémica purificada. Expresión del CD5 (FITC), CD19 (PE), HLA-DR (TC).



#2:94109015

#2:94109015

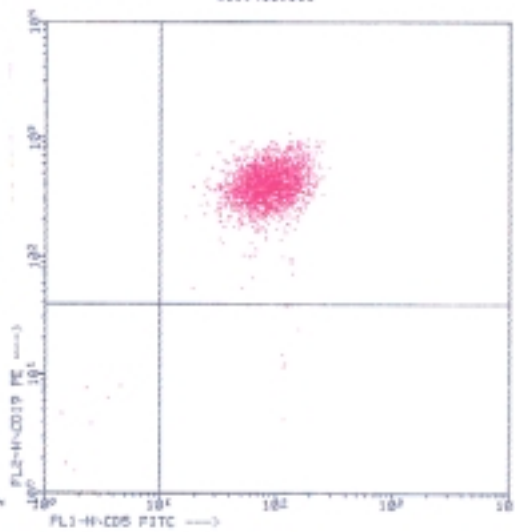
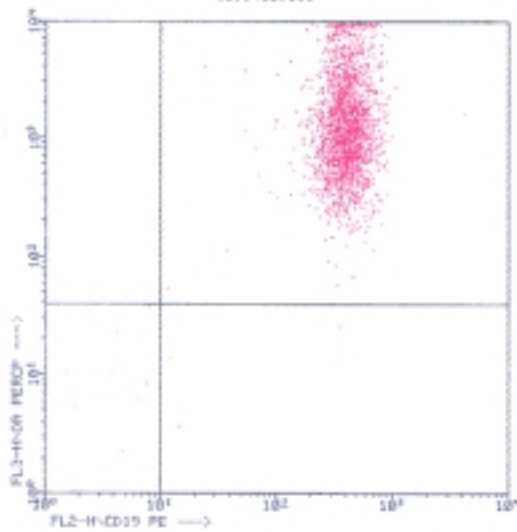
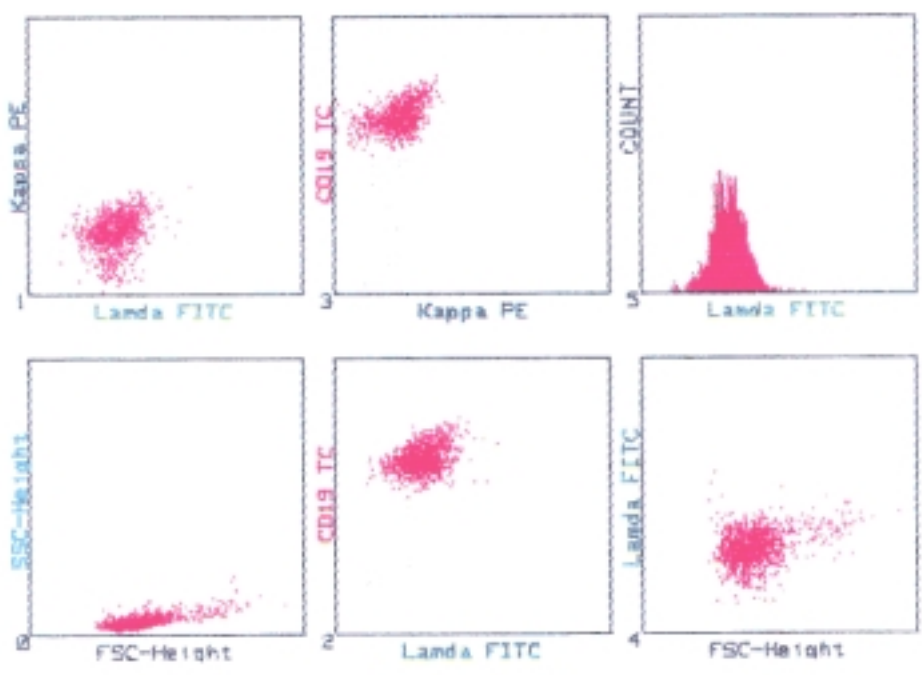
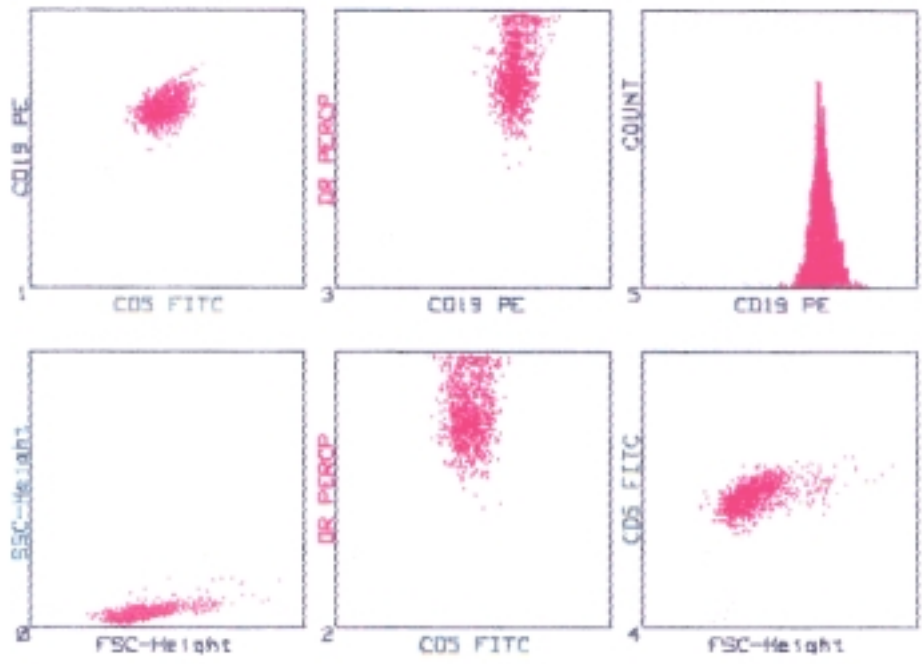


FIGURA 3. Análisis por "Paint a gate" de la población leucémica purificada. Expresión del CD5 (FITC), CD19 (PE), HLA-DR (TC)

FIGURA 4. Análisis por "Paint a gate" de la población leucémica purificada. Expresión de la cadena λ de las inmunoglobulinas (FITC), κ (PE), CD19 (TC)



Intensidad de fluorescencia

Se ha hallado el valor de la intensidad de fluorescencia para los antígenos CD5, CD19, CD20, cadenas κ o λ y HLA DR como medida indirecta de la densidad antigénica en la superficie de la membrana celular. Los resultados de la media y mediana de medias de las intensidades de fluorescencia vienen expresados en las Tablas 10a y 10b, respectivamente.

La intensidad de expresión de los antígenos de superficie CD5 y CD19 fue similar, aunque ligeramente superior para el CD19, cuando se estudió con anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína (FITC). El antígeno CD45 FITC se expresó de forma más intensa que los antígenos CD19 y CD5.

Cuando el análisis se hizo con un anticuerpo monoclonal conjugado con ficoeritrina (PE), la intensidad de fluorescencia del antígeno CD19 fue superior a la del CD20. Destaca la menor densidad antigénica del CD20 en la superficie de los linfocitos B de la LLC-B, con relación al resto de los antígenos que caracterizan la célula leucémica, incluido la expresión de la cadena ligera de la inmunoglobulina kappa o lambda. Las cadenas κ o λ se han estudiado con anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína o ficoeritrina dependiendo de las muestras, y en ambos casos la densidad antigénica fue mayor cuando se utilizaron conjugados con PE.

Cuando el estudio se realizó con anticuerpos específicos conjugados con una sustancia fluorescente naranja (TC), la intensidad de fluorescencia fue mayor para el antígeno HLA DR, que para los antígenos CD19 y CD5, y a su vez mayor para el CD19 que para el CD5.

2.3. Expresión del antígeno de activación CD25

En veintiuna de las muestras se analizó la expresión del antígeno de superficie de membrana CD25, que representa la cadena alfa del receptor de la interleucina 2 (Tabla 7). En todos los casos se estudió la presencia del antígeno en las células B, a juzgar por la coexpresión del CD19, demostrada mediante una

TABLA 10. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE LOS ANTÍGENOS ESTUDIADOS EN LA POBLACIÓN B LEUCÉMICA

a) MEDIA DE MEDIAS ± D.S. (RANGO).

Antígenos de membrana	FITC	PE	TC
CD19	48.8 ± 21.9 (18.9 - 99.2)	246.7 ± 113.3 (60.9 - 579.6)	306.1 ± 179.5 (20.8 - 817.0)
CD5	45.3 ± 26.2 (4.6 - 104.6)	-	198.9 ± 127.9 (17.5 - 500.2)
CD20	-	77.1 ± 118.2 (8.5 - 610.8)	-
HLA DR	-	-	533.2 ± 692.5 (58.7 - 3574.6)
CD45	126.0 ± 68.3 (37.8 - 276.1)	-	-
λ/	32.9/	110.6 ± 101.9/ (22.5 - 274.0)/	-
/κ	/17.5 ± 7.7 /(6.3 - 28.0)	/130.7 ± 78.4 /(43 - 341.8)	-
CD71	8.6 ± 3.3 (4.3 - 16.2)	-	-
CD25	-	19.1 ± 9.2 (5.6 - 35.3)	-

b) MEDIANA DE MEDIAS.

Antígenos de membrana	FITC	PE	TC
CD19	43.6	211.2	284.6
CD5	44.1	-	175.0
CD20	-	39.0	-
HLA DR	-	-	726.7
CD45	116.4	-	-
λ/κ	32.9/19.0	110.5/118.4	-
CD71	8.1	-	-
CD25	-	16.6	-

técnica de triple marcaje (Tabla 9; Figura 6). El análisis se llevó a cabo en todas las muestras con un anticuerpo monoclonal conjugado con ficoeritrina.

La media del porcentaje de células que expresaban la cadena alfa del receptor de la IL-2 fue del $51.0\% \pm 30.9$ (rango: 0 - 95%) (Tablas 7 y 8). Seis de los pacientes con LLC-B expresaban el CD25 en un porcentaje igual o inferior al 20% de sus células; en tres de ellas la presencia del CD25 era prácticamente inexistente. En las quince muestras restantes, la expresión del CD25 osciló entre el 35% y el 95%.

Se ha hallado el valor de la intensidad de fluorescencia para el antígeno CD25. La media de medianas de la intensidad de fluorescencia fue de 19.1 ± 9.2 (rango: 5.6 - 35.3), y la mediana de medianas de 16.6 (Tablas 10a y 10b). Ambos valores fueron inferiores a los obtenidos para el resto de los antígenos de membrana estudiados en los linfocitos B leucémicos, ya detallados.

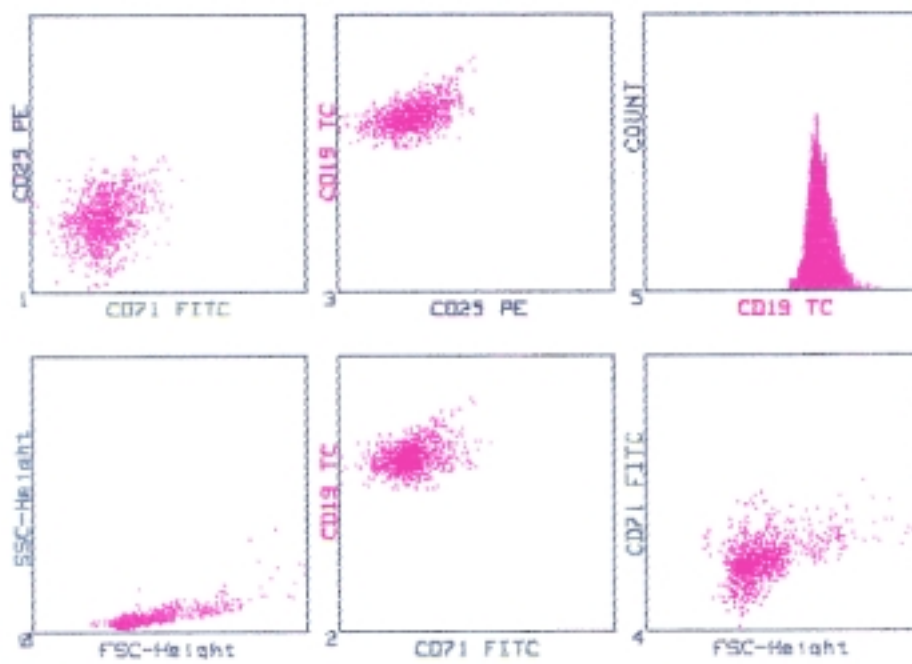
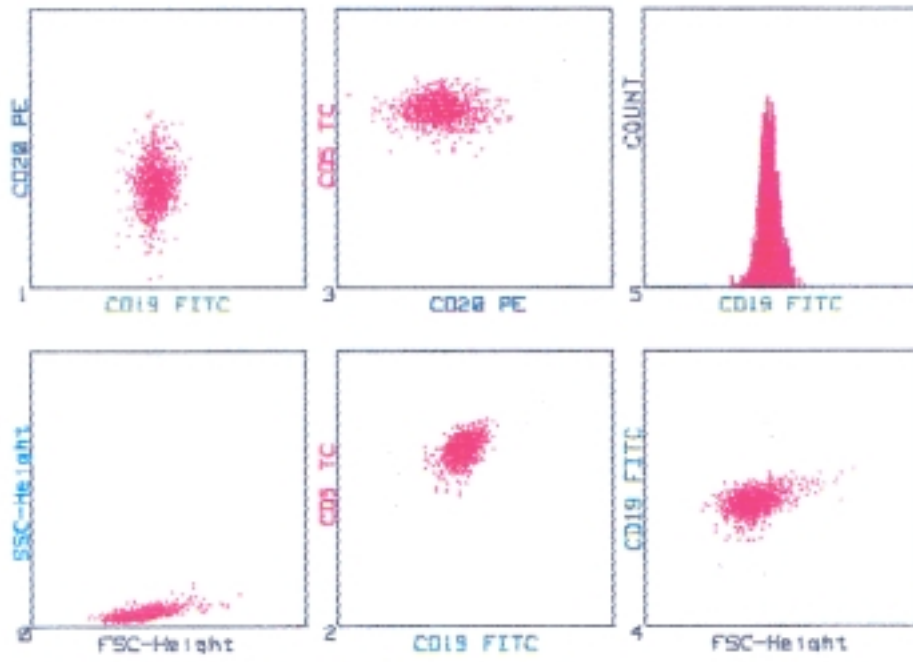
Al igual que ocurría con el CD20, se ha objetivado para el CD25 una población celular uniforme sin una buena discriminación frente al valor elegido como negativo, por su baja densidad antigénica en la superficie de membrana. Por eso, al emplear el método de la sustracción de histogramas, el porcentaje de células que expresaban la cadena alfa del receptor de la IL-2 aumentó.

2.4. Expresión del antígeno de proliferación CD71

Los linfocitos B de las muestras purificadas no expresaban, en situación basal, el antígeno de proliferación CD71 (el porcentaje fue 0 en todas las diecinueve muestras analizadas). El estudio se ha realizado con un anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína. De igual forma que para el antígeno CD25, se ha estudiado la coexpresión de los antígenos CD19 y CD71 mediante una técnica directa de marcaje con triple color (Figura 6). La media de medias de la intensidad de fluorescencia fue 8.6 ± 3.3 (rango: 4.3 - 16.2) y la mediana de medias 8.1 (Tablas 10a y 10b).

FIGURA 5. Análisis por "Paint a gate" de la población leucémica purificada. Expresión del CD19 (FITC), CD20 (PE), CD5 (TC)

FIGURA 6. Análisis por "Paint a gate" de la población leucémica purificada. Expresión del CD71 (FITC), CD25 (PE), CD19 (TC)



2.5. Expresión del receptor de la IL-6 en la membrana de los linfocitos B leucémicos

Se estudió la expresión del receptor de la IL-6 mediante técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta.

2.5.a. Técnica de inmunofluorescencia directa

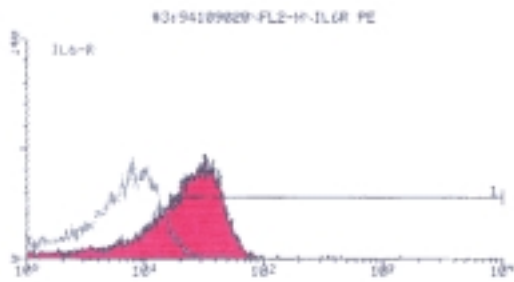
En veintiocho pacientes se estudió la expresión del receptor de la interleucina 6 en la membrana de los linfocitos B leucémicos en situación basal. Para ello se empleó la propia interleucina 6 -ligando de dicho receptor- conjugada con ficoeritrina y se realizó el análisis sobre la población de células leucémicas CD19 (+), CD5 (+) (Figuras 7 y 8).

En todos los casos se objetivó la presencia del receptor de la IL-6 en un $91.2\% \pm 4.9$ (rango: 85% - 100%) de las células tumorales (Tabla 11). Estos resultados provienen de realizar el cálculo matemático de la sustracción de histogramas que efectúa el programa "Lysys II" del citómetro de flujo, ya que al igual que ocurría con el antígeno CD25 y CD20, el R-IL6 tiene una baja densidad antigénica en la superficie de la membrana de los linfocitos B leucémicos.

Se analizó la expresión del receptor de la IL-6 en las células leucémicas de las muestras según el estadio de la clasificación de Rai. De los veintiocho pacientes estudiados, dieciséis estaban en el estadio 0, expresando el R-IL6 en el $93.1\% \pm 4.6$ (rango: 85% - 100%); tres estaban en el estadio I, expresando el R-IL6 en el $88.3\% \pm 2.9$ (rango: 85% - 90%); ocho en el II, expresando el R-IL6 en el $88.7\% \pm 5.2$ (rango: 80% - 95%); uno en el estadio III, que expresaba el receptor de la citocina en el 90% de las células; por último, ninguno estaba en el estadio IV.

Cuando se distribuyeron los pacientes según los grupos de riesgo diferenciados por Rai, se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la expresión del receptor de la IL-6 en los linfocitos B de las dieciséis muestras en el grupo de riesgo bajo (estadio 0) y la de las once incluidas en el grupo de riesgo intermedio (estadios I y II). No se pudo realizar el estudio estadístico entre esos dos grupos de riesgo y el formado por los pacientes en el grupo de riesgo alto (estadios III y IV), por constar éste de sólo un paciente.

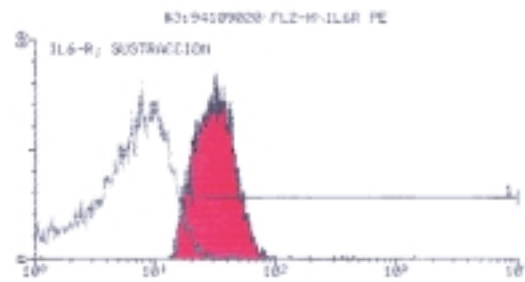
FIGURA 7. Análisis por "Lysys II" de la expresión del receptor de la IL-6 en la población leucémica purificada, mediante una técnica directa de inmunofluorescencia y utilizando como ligando la IL-6 conjugada con PE. Empleo del cálculo matemático de la sustracción de histogramas. Expresión del CD19 (FITC), R-IL6 (PE), CD5 (TC).



80:94109829-FL2-H-IL6R PE

--- Arithmetic Histogram Statistics for 80:94109829
 Parameter FL2-H IL6R PE Gate G1= R1

N	Left,Right	Events	%	Peak	FlCh1	Mean
0	1.00, 9918	9662	100.00	117	1.00	25.30
1	19.90, 9918	5740	59.49	67	31.62	35.16



80:94109829-FL2-H-IL6R PE

--- Arithmetic Histogram Statistics for 80:94109829
 Parameter FL2-H IL6R PE Gate G1= R1

N	Left,Right	Events	%	Peak	FlCh1	Mean
0	1.00, 9918	4319	100.00	67	31.62	35.42
1	19.90, 9918	5618	68.98	67	31.62	35.42

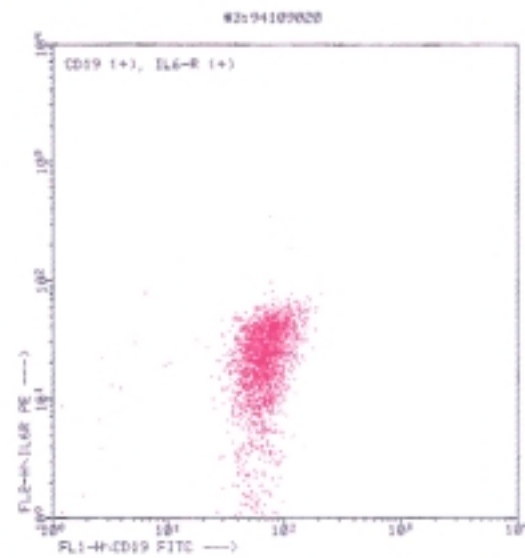
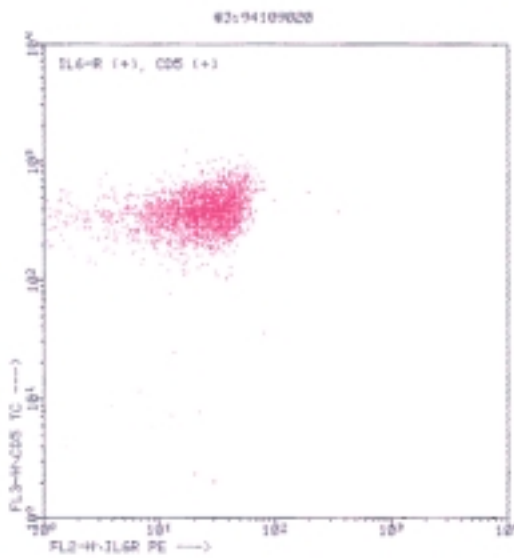
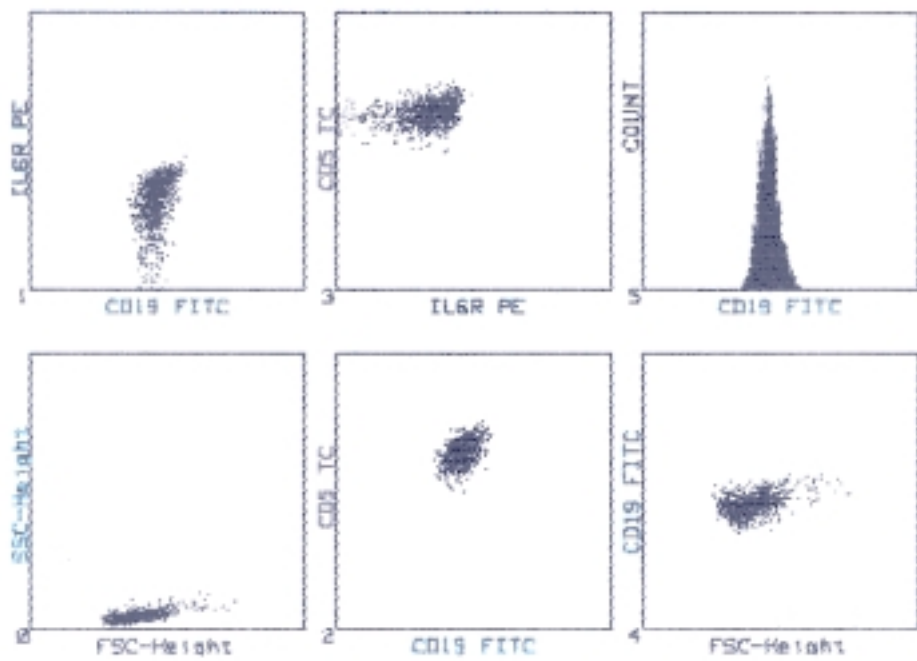


FIGURA 8. Análisis por "Paint a gate" de la expresión del receptor de la IL-6 en la población leucémica purificada, mediante una técnica directa de inmunofluorescencia y utilizando como ligando la IL-6 conjugada con PE. Expresión del CD19 (FITC), R-IL6 (PE), CD5 (TC)



Se halló la intensidad de fluorescencia de la expresión del R-IL6. La media de medias de la intensidad de fluorescencia fue de 17.4 ± 5.2 (rango: 7.5 - 27.4); la media de medianas fue de 15.7 ± 4.9 (rango: 6.4 - 25.9) (Tablas 10a , 10b y 11). Estos valores son similares a los obtenidos en el análisis de la expresión del CD25 en las mismas células leucémicas y, por lo tanto, inferiores a los objetivados para el resto de antígenos de membrana.

2.5.b. Técnica de inmunofluorescencia indirecta

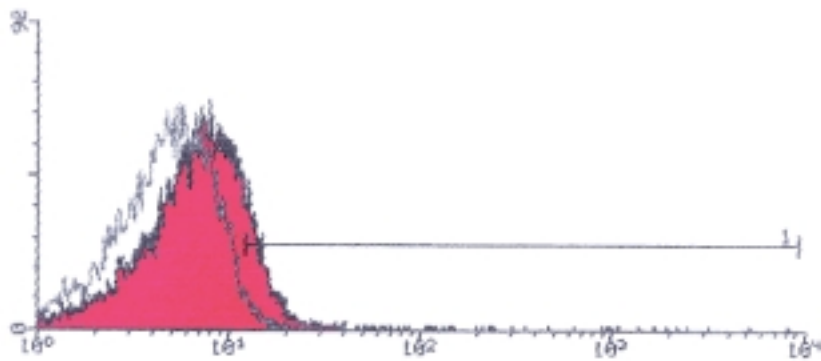
En quince de los veintiocho pacientes anteriores se analizó la expresión del receptor de la interleucina 6 en la membrana de los linfocitos B leucémicos utilizando un anticuerpo específico frente a dicho receptor, por una técnica de inmunofluorescencia indirecta. El anticuerpo monoclonal se conjugó con fluoresceína. El estudio se realizó sobre la población de células B purificadas, tras haber llevado a cabo la exclusión de los linfocitos T de la población leucémica (Figura 9).

Se objetivó la presencia del receptor de la IL-6 en un 20 a 85% de las células tumorales, con una media del $52.5\% \pm 16.7$ (Tabla 12). Estos resultados provienen, de igual forma que se describe para la técnica directa, de realizar el cálculo matemático de la sustracción de histogramas que efectúa el programa "Lysys II" del citómetro de flujo.

Se analizó la expresión del receptor de la IL-6 en las células leucémicas de las muestras distribuidas según los estadios de la clasificación de Rai. De los quince pacientes estudiados, diez estaban en el estadio 0 y expresaban dicho antígeno de membrana en el $50.6\% \pm 19.1$ (rango: 20% - 85%); un enfermo estaba en el estadio I, y expresaba el receptor de la citocina en el 53% de las células; cuatro en el estadio II, con una expresión del $48.7\% \pm 5.4$ (rango: 40% - 55%); ningún paciente estaba en el estadio III o IV.

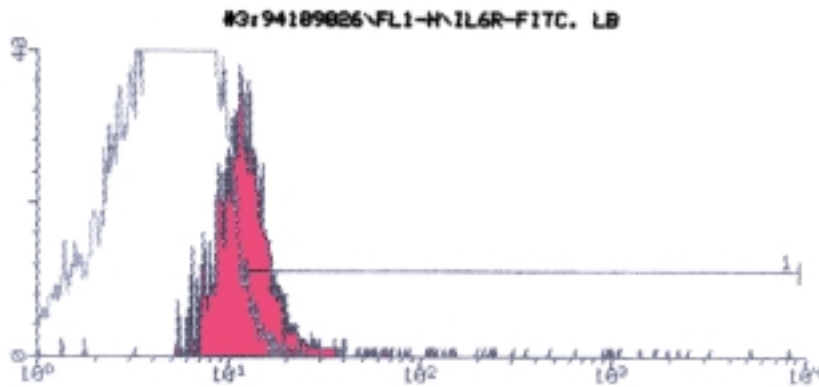
Se halló la intensidad de fluorescencia de la expresión del R-IL6. La media de medias de la intensidad de fluorescencia fue de 13.4 ± 8.2 (rango: 3.6 - 34.5); la media de medianas fue de 6.3 ± 2.0 (rango: 2.9 - 11.0) (Tabla 12). Estos valores son inferiores a los obtenidos en el análisis de la expresión del receptor de la interleucina 6, realizado mediante la técnica directa.

FIGURA 9. Análisis por "Lysys II" de la expresión del receptor de la IL-6 en la población leucémica purificada, mediante una técnica indirecta de inmunofluorescencia. Expresión del CD19 (FITC), R-IL6 (PE)



#3:94189826\FL1-H\IL6R-FITC. LB
 --- Arithmetic Histogram Statistics for #3:94189826
 Parameter FL1-H IL6R-FITC. LB Gate G1= R1

M	Left,Right	Events	%	Peak	PkCh1	Mean
0	1.00, 9918	9876	100.00	76	1.00	12.19
1	12.18, 9398	1329	14.64	44	12.74	45.91



#3:94189826\FL1-H\IL6R-FITC. LB
 --- Arithmetic Histogram Statistics for #3:94189826
 Parameter FL1-H IL6R-FITC. LB Gate G1= R1

M	Left,Right	Events	%	Peak	PkCh1	Mean
0	1.00, 9918	2418	100.00	38	11.44	29.28
1	12.18, 9398	1135	46.93	36	12.74	51.88

TABLA 11. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DEL R-IL6 MEDIANTE TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA EN LOS LINFOCITOS B DE LA LLC: PORCENTAJE DE EXPRESIÓN (CON Y SIN SUSTRACCIÓN) E INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA (I.F)

Paciente	R-IL6 (%)	R-IL6 (%) sustracción	R-IL6 (I.F.) medias	R-IL6 (I.F.) medianas
1	40	90	15.2	13.2
2	50	90	14.5	12.8
4	75	90	24.5	23.8
5	80	95	22.1	21.2
7	85	95	12.0	11.1
8	60	95	13.0	10.8
9	65	90	15.5	14.7
10	50	85	17.8	16.4
13	60	90	19.1	17.9
14	50	95	22.2	17.3
15	85	95	20.1	19.1
16	50	90	24.0	17.7
18	50	90	18.0	16.4
20	75	95	27.4	25.9
21	70	95	13.0	11.8
22	60	90	16.8	15.1
24	85	100	23.6	20.1
26	45	85	12.7	11.3
27	70	95	24.2	22.8
29	85	100	21.0	19.3
31	35	85	7.5	6.4
32	45	85	15.1	13.4
33	45	80	10.7	10.0
34	55	85	25.0	23.7
35	80	100	16.8	15.6
37	55	90	15.1	14.0
38	45	90	12.0	10.3
39	40	90	9.3	7.5

n=28	60.4%± 15.6* (35% - 85%)	91.2% ± 4.9 (85% - 100%)	17.4 ± 5.2 (7.5 - 27.4)	15.7 ± 4.9 (6.4 - 25.9)
------	-----------------------------	-----------------------------	----------------------------	----------------------------

* Media ± D.S. (Rango)

TABLA 12. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DEL R-IL6 MEDIANTE TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN LOS LINFOCITOS B DE LA LLC: PORCENTAJE DE EXPRESIÓN (CON Y SIN SUSTRACCIÓN) E INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA (I.F)

Paciente	R-IL6 (%)	R-IL6 (%) sustracción	R-IL6 (I.F) medias	R-IL6 (I.F) medianas
5	10	35	7.7	5.1
7	15	50	12.6	5.7
9	10	40	12.2	8.4
13	15	50	11.3	7.0
16	25	50	17.9	11.0
18	10	20	3.6	2.9
21	20	45	9.0	5.1
22	10	45	5.5	3.8
24	30	85	8.2	5.2
27	25	55	11.0	7.5
29	45	85	34.5	8.0
35	20	60	23.0	8.2
37	25	70	10.6	6.8
38	20	53	25.9	5.5
39	10	45	7.4	4.2
n=15	19.3% ± 9.5* (10% - 45%)	52.5 ± 16.7 (20% - 85%)	13.4 ± 8.2 (3.6 - 34.5)	6.3 ± 2.0 (2.9 - 11.0)

* Media ± D.S. (Rango)

3. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS AL PDB, A LA PHA Y AL SAC₂ + PDB

Los experimentos se diseñaron con una duración de tres y siete días; en el primer caso se utilizaron 100.000 células por pocillo y en el segundo 100.000 y 500.000 células por pocillo. Se analizó la respuesta proliferativa de los linfocitos B leucémicos en cultivo a la PHA y al éster del forbol (PDB) de forma aislada (en cultivo de tres y siete días), y al activador policlonal de linfocitos B (SAC₂) en combinación con el PDB (en cultivo de tres días).

3.1. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a tres días

El estudio de la respuesta proliferativa al PDB y a la PHA incluyó treinta y nueve muestras de linfocitos B purificados. Tras excluir los pacientes cuyo porcentaje de monocitos y/o linfocitos T era superior al 5%, los resultados se redujeron al análisis de treinta muestras. Por lo que hace referencia al uso del SAC₂ en asociación al PDB, el análisis se realizó en dieciocho muestras (Tabla 13; Figura 10).

3.1.a. Empleo del PDB de forma aislada

La media de los índices de proliferación obtenidos con el PDB fue de 2.97 ± 9.71 (rango: 0.22 - 54.10), y la mediana fue de 1.16.

3.1.b. Empleo de la PHA de forma aislada

La media de los índices de proliferación obtenidos con la PHA fue de 1.02 ± 1.19 (rango: 0.22 - 6.50). El valor de la mediana fue de 0.68, valor esperado por ser el PHA un estímulo para la proliferación de células T y estar trabajando con linfocitos B de la LLC-B.

TABLA 13. ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS B EN CULTIVO CON PDB, PHA Y SAC₂ + PDB

Cultivo	Número de muestras	PDB	PHA	SAC ₂ + PDB**
3 días; 100.000 cél./pocillo	30	2.97 ± 9.71* (0.22 - 54.10) 1.16	1.02 ± 1.19 (0.22 - 6.50) 0.68	1.84 ± 2.23 (0.25 - 8.29) 1.03
7 días; 100.000 cél./pocillo	17	1.31 ± 1.40 (0.34 - 5.84) 0.84	3.06 ± 3.25 (0.27 - 9.32) 1.32	-
7 días; 500.000 cél./pocillo	21	1.32 ± 0.98 (0.00 - 3.16) 1.14	3.75 ± 6.64 (0.00 - 21.45) 0.88	-

* Media ± D.S. (rango). Mediana.

** El número de muestras analizadas fue de 18.

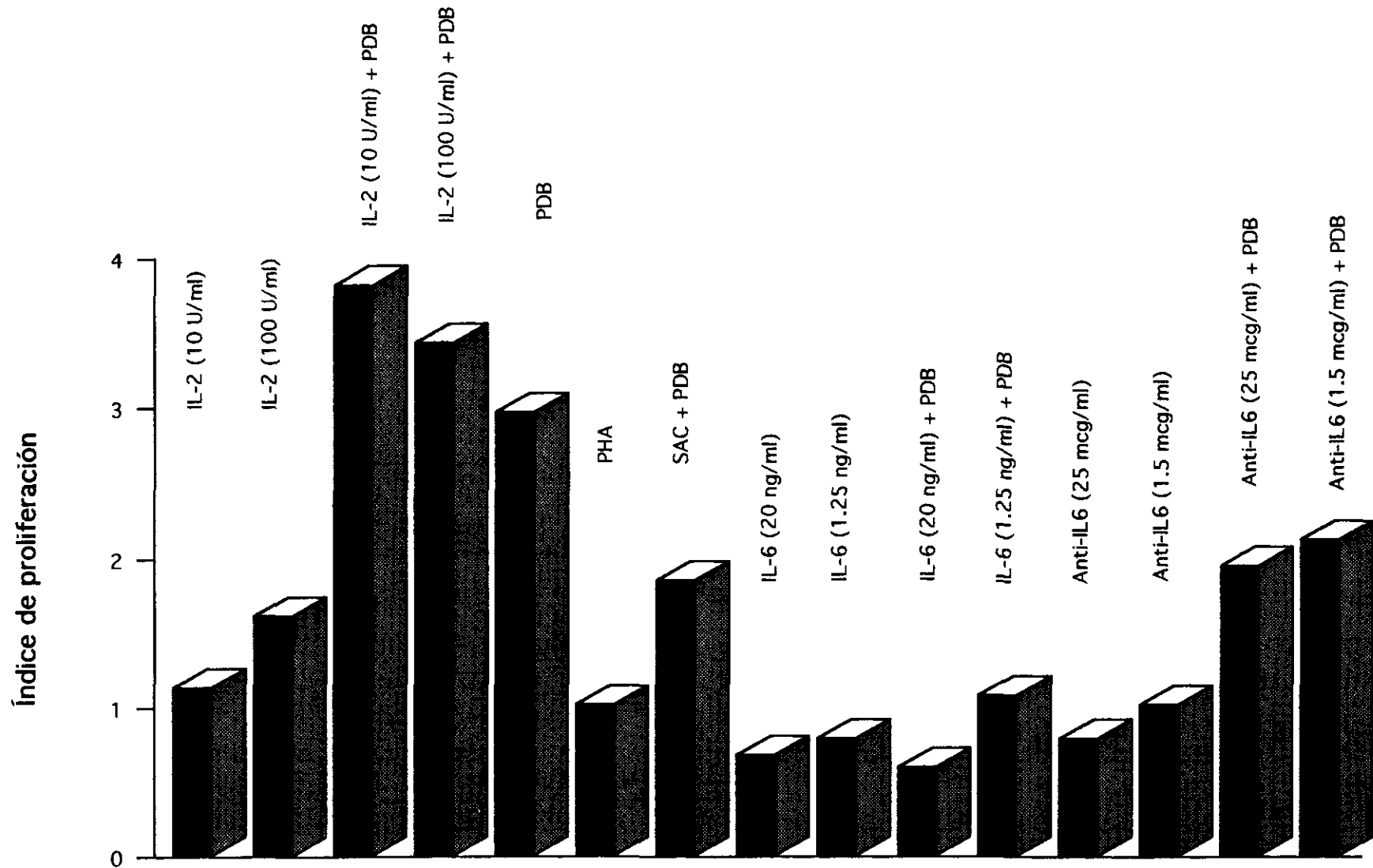


FIGURA 10. Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a los diferentes mitógenos utilizados: IL-2 (10 y 100 U/ml) -aislada o en asociación al PDB-, PDB, PHA, SAC + PDB, IL-6 (20 y 1.25 ng/ml) -aislada o en asociación al PDB-, Anti-IL6 (25 y 1.5 mcg/ml) -aislado o en asociación al PDB-. Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo.

3.1.c. Empleo del SAC₂ en asociación al PDB

La media de los índices de proliferación obtenidos con la asociación del SAC₂ y el PDB fue de 1.84 ± 2.23 (rango: 0.25 - 8.29). La mediana de los índices de proliferación fue de 1.03.

3.2. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días

Los experimentos de proliferación se llevaron a cabo utilizando una concentración de 100.000 y 500.000 células por cada pocillo de la placa de proliferación.

3.2.a. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días con 100.000 células por pocillo

Se utilizaron el éster del forbol y la PHA sin combinación con otros mitógenos. El estudio de la respuesta proliferativa a ambos mitógenos incluyó diecisiete muestras de células B purificadas, una vez separadas del análisis tres muestras cuyo grado de purificación no reunía los criterios exigidos (Tabla 13; Figura 11).

3.2.a.1. Empleo del PDB de forma aislada

La media de los índices de proliferación obtenidos con el PDB fue de 1.31 ± 1.40 (rango: 0.34 - 5.84), y la mediana de 0.84.

3.2.a.2. Empleo de la PHA de forma aislada

La media de los índices de proliferación obtenidos con la PHA fue de 3.06 ± 3.25 (rango: 0.27 - 9.32). El valor de la mediana fue de 1.32.

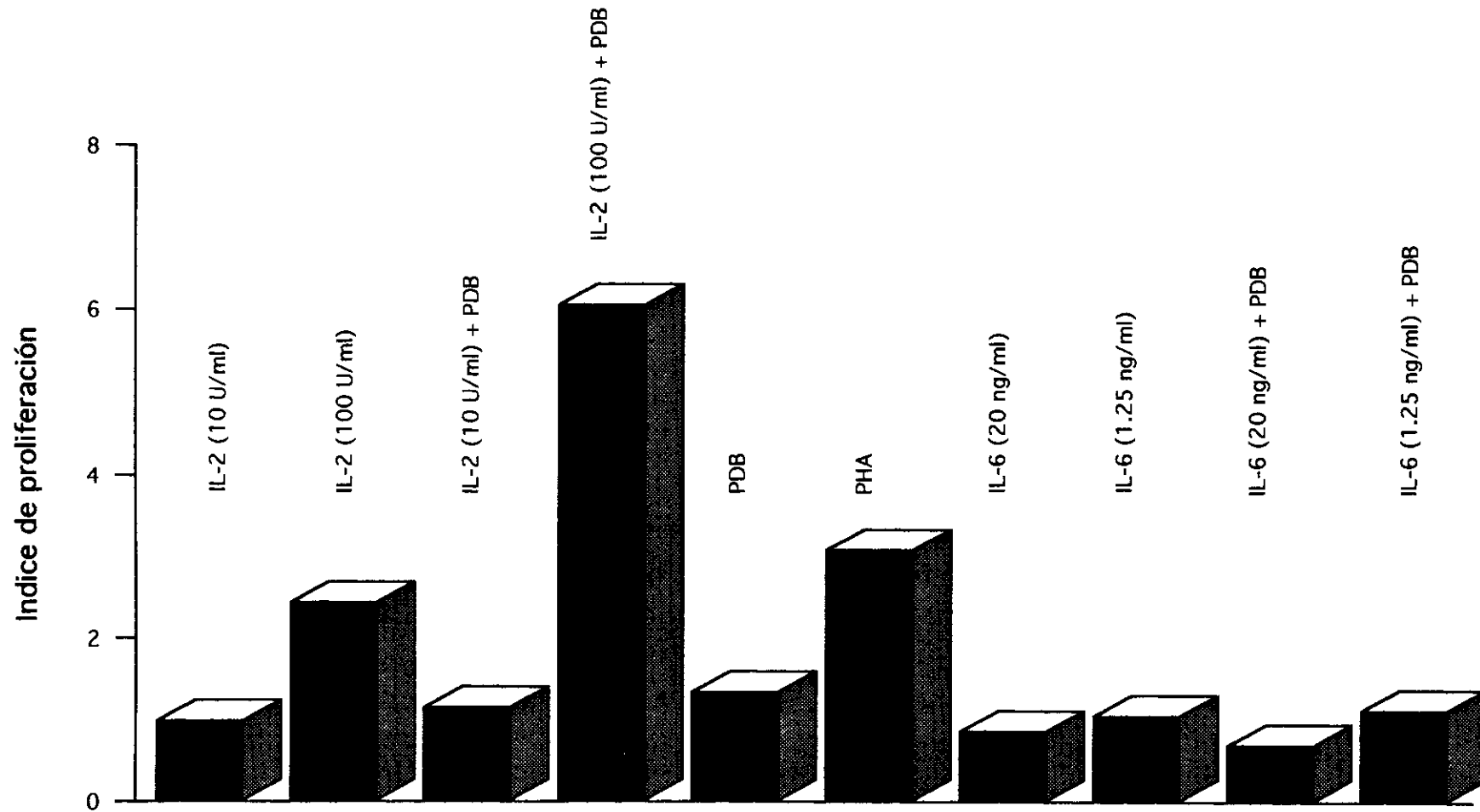


FIGURA 11. Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a los diferentes mitógenos utilizados: IL-2 (10 y 100 U/ml) -aislada o en asociación al PDB-, PDB, PHA, IL-6 (20 y 1.25 ng/ml) -aislada o en asociación al PDB-. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo.

3.2.b. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días con 500.000 células por pocillo

Se utilizaron el éster del forbol y la PHA sin combinación con otros mitógenos. El estudio de la respuesta proliferativa a ambos mitógenos incluyó veintiuna muestras de linfocitos B purificados, habiendo nuevamente excluido del análisis dos pacientes con insuficiente grado de purificación celular leucémica (Tabla 13; Figura 12).

3.2.b.1. Empleo del PDB de forma aislada

La media de los índices de proliferación obtenidos con el PDB fue de 1.32 ± 0.98 (rango: 0.00 - 3.16), y la mediana de 1.14.

3.2.b.2. Empleo de la PHA de forma aislada

La media de los índices de proliferación obtenidos con la PHA fue de 3.75 ± 6.64 (rango: 0.00 - 21.45). El valor de la mediana fue de 0.88, lo que refleja la ausencia de linfocitos T en las muestras analizadas.

4. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS A LA IL-2 EXÓGENA

Se analizó la respuesta proliferativa de los linfocitos B leucémicos a la IL-2 (dosis de 10 U/ml y 100 U/ml) y a la IL-2 en combinación con el éster del forbol (PDB). La duración de los cultivos fue de tres y siete días (Figuras 10, 11, 12 y 13). También se analizó si el grado de expresión del antígeno CD25 por las células leucémicas tenía relación con la respuesta proliferativa de estas células en cultivo, con los mitógenos mencionados.

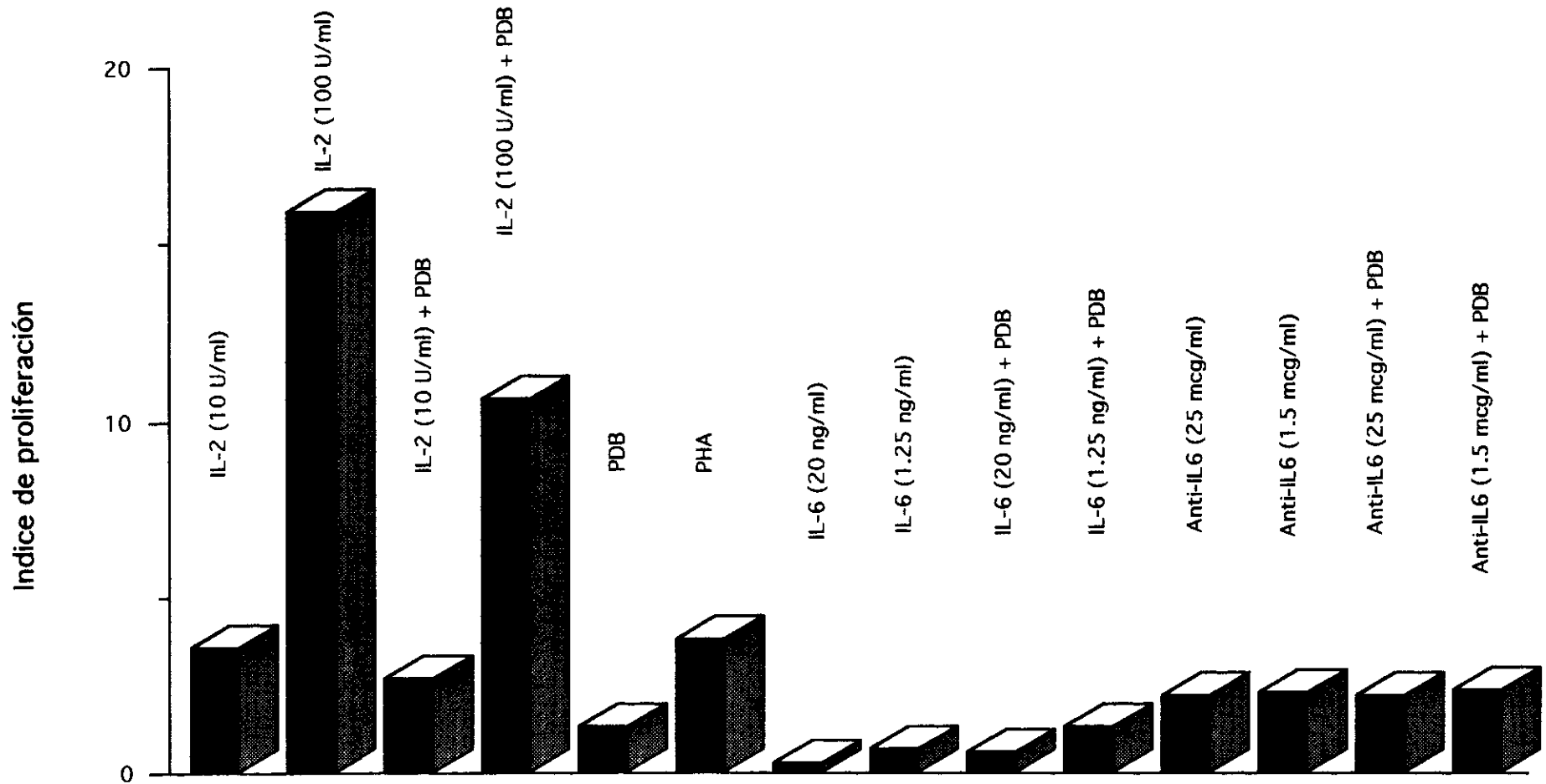


FIGURA 12. Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a los diferentes mitógenos utilizados: IL-2 (10 y 100 U/ml) -aislada o en asociación al PDB-, PDB, PHA, IL-6 (20 y 1.25 ng/ml) -aislada o en asociación al PDB-, Anti-IL6 (25 y 1.5 mcg/ml) -aislado o en asociación al PDB-. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 500.000 células por pocillo.

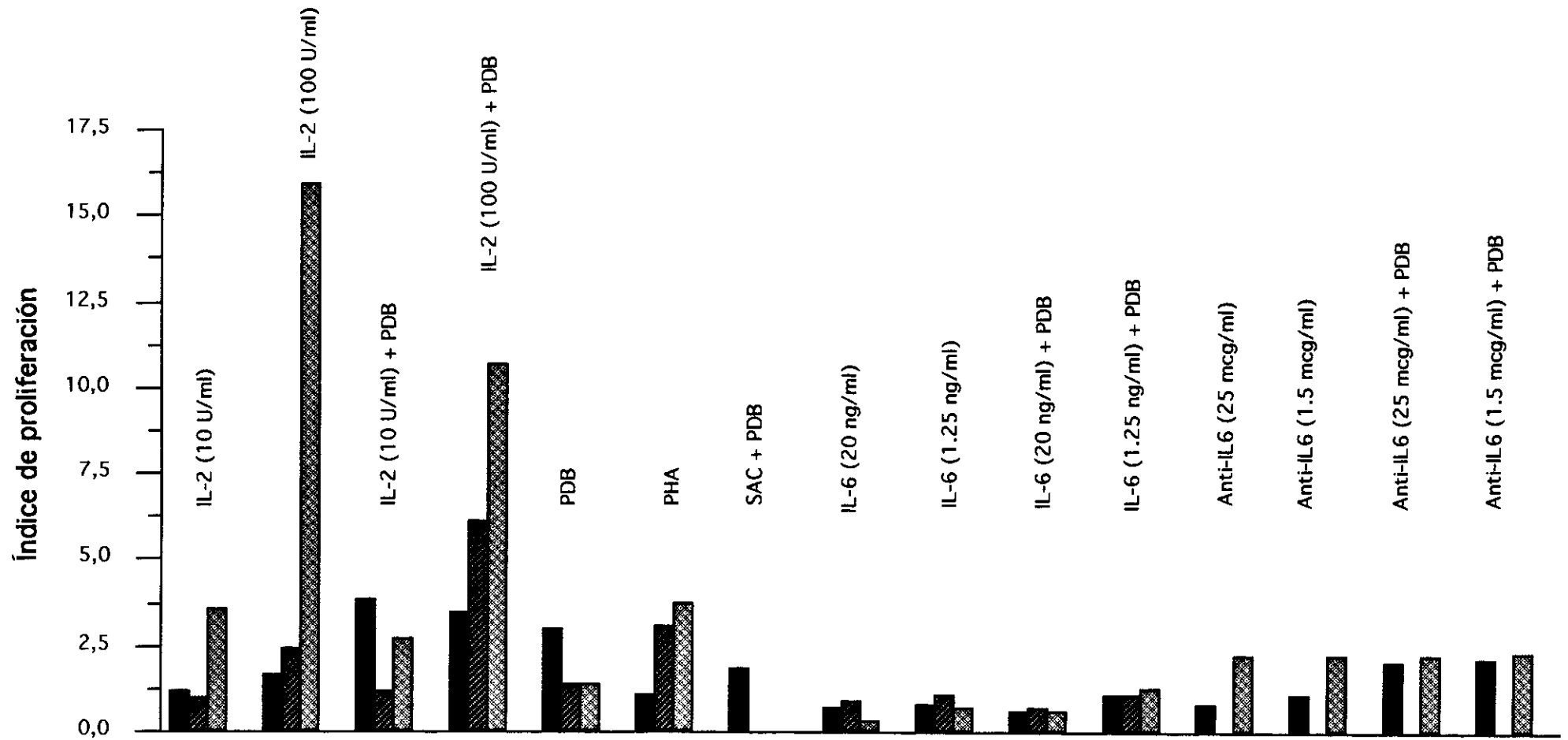


FIGURA 13. Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a los diferentes mitógenos utilizados: IL-2 (10 y 100 U/ml) -aislada o en asociación al PDB-, PDB, PHA, SAC + PDB, IL-6 (20 y 1.25 ng/ml) -aislada o en combinación con el PDB-, Anti-IL6 (25 y 1.5 mcg/ml) -aislado o en asociación al PDB-. Experimentos realizados con una duración de tres y siete días, con una concentración celular de 100.000 y 500.000 células por pocillo (c/p).

■ 3 días, 100.000 c/p

■ 7 días, 100.000 c/p

■ 7 días, 500.000 c/p

4.1. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a tres días

La concentración celular empleada fue de 100.000 células por pocillo de la placa de proliferación. Se utilizó la IL-2 a las dosis de 10 y 100 U/ml, de forma aislada y en combinación con el éster del forbol. Tras haber realizado el experimento en treinta y siete pacientes, el análisis incluyó veintinueve muestras de linfocitos B purificados, ya que las demás no presentaron el grado de purificación celular leucémico apropiado (Tabla 14).

4.1.a. Empleo de la IL-2 de forma aislada

La media de los índices de proliferación para la IL-2 exógena empleada a la dosis de 10 U/ml fue de 1.13 ± 1.04 (rango: 0.21 - 4.14; mediana: 0.80); y a la dosis de 100 U/ml fue de 1.60 ± 1.20 (rango: 0.32 - 5.79; mediana: 1.56) ($p < 0.001$).

Por lo tanto, la IL-2 recombinante utilizada en el cultivo como mitógeno aislado no indujo la proliferación de los linfocitos B leucémicos, puesto que las medias de los índices de proliferación no superaron la cifra establecida de 2.00.

4.1.b. Empleo de la IL-2 en asociación al PDB

Al utilizar la IL-2 recombinante a la dosis de 10 U/ml, en combinación con el éster del forbol, la media de los índices de proliferación fue de 3.83 ± 13.25 (rango: 0.23 - 72.22; mediana: 0.80), y de 3.44 ± 9.76 al emplear la IL-2 a la dosis de 100 U/ml en asociación al PDB (rango: 0.23 - 53.23; mediana: 1.03) ($p < 0.05$).

La combinación de esta citocina con el éster del forbol no tuvo un efecto positivo sobre la proliferación celular leucémica. La asociación de ambos mitógenos no llevó consigo un aumento en los valores de los índices de proliferación con respecto al empleo de la IL-2 de forma aislada (n.s.). Estos resultados derivan de los datos obtenidos de las medianas de los índices de proliferación, más valorables que las cifras de las medias, debido al elevado valor de la desviación típica.

TABLA 14. ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS B EN CULTIVO CON IL-2 E IL-2 + PDB

Cultivo	Número de muestras	IL-2: 10 U/ml	IL-2: 100 U/ml	PDB + IL-2: 10 U/ml	PDB + IL-2: 100 U/ml
3 días; 100.000 cél./pocillo	29	1.13 ± 1.04* (0.21 - 4.14) 0.80	1.60 ± 1.20 (0.32 - 5.79) 1.56	3.83 ± 13.25 (0.23 - 72.22) 0.80	3.44 ± 9.76 (0.23 - 53.2) 1.03
7 días; 100.000 cél./pocillo	14	0.95 ± 0.50 (0.35 - 1.99) 0.82	2.40 ± 2.55 (0.87 - 10.48) 1.48	1.12 ± 1.56 (0.20 - 5.85) 0.62	6.04 ± 17.86 (0.21 - 61.2) 0.66
7 días; 500.000 cél./pocillo	14	3.55 ± 5.62 (0.16 - 21.7) 1.69	15.91 ± 35.81 (0.17 - 133.2) 4.24	2.62 ± 2.77 (0.17 - 10.30) 2.11	10.62 ± 24.5 (0.14 - 88.8) 1.48

* Media ± D.S. (rango). Mediana.

4.1.c. Influencia de la expresión del antígeno CD25 por las células leucémicas en la respuesta proliferativa a la IL-2, empleada sola o en combinación con el PDB

En diecinueve de las veintinueve muestras estudiadas se determinó la expresión del antígeno de activación CD25. Cinco de ellas presentaban el CD25 en un porcentaje inferior al 20% (0, 0, 2%, 10%, 15%) y en las catorce muestras restantes la expresión de dicho antígeno de membrana era superior o igual al 20%.

El valor de la media de los índices de proliferación, al emplear la IL-2 recombinante a 10 U/ml y 100 U/ml, tanto de forma aislada como en asociación al éster del forbol, fue inferior en los pacientes que expresaban el antígeno CD25 en un porcentaje inferior al 20%, que en las catorce muestras de linfocitos B purificados cuya expresión del CD25 era superior o igual al 20% (Tabla 15). Sin embargo, el análisis estadístico no demostró una diferencia estadísticamente significativa.

4.2. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días

Los experimentos de proliferación se llevaron a cabo utilizando unas concentraciones de 100.000 y 500.000 células por pocillo.

4.2.a. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días con 100.000 células por pocillo

En este análisis se incluyeron catorce muestras de linfocitos B purificados, una vez excluidas otras dos muestras con insuficiente grado de purificación celular leucémica. Al igual que en el experimento previo, se empleó la IL-2, sola o en combinación con el éster del forbol, a las dosis de 10 U/ml y 100 U/ml (Tabla 14).

TABLA 15. ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS B EN CULTIVO CON IL-2 e IL-2 + PDB: 3 DÍAS DE CULTIVO/100.000 CÉLULAS POR POCILLO

Pacientes n=19	IL-2: 10 U/ml	IL-2: 100 U/ml	PDB + IL-2: 10 U/ml	PDB + IL-2: 100 U/ml
CD25 < 20% n=5	0.61 ± 0.24 * (0.33 - 0.78)	1.21 ± 0.78 (0.32 - 1.78)	1.04 ± 0.21 (0.80 - 1.16)	1.11 ± 0.20 (0.98 - 1.34)
CD25 ≥ 20% n=14	1.22 ± 1.13 (0.21 - 4.02)	1.53 ± 1.12 (0.55 - 4.80)	1.91 ± 2.14 (0.25 - 5.90)	2.16 ± 2.61 (0.23 - 8.05)

* Media ± D.S. (rango).

TABLA 16. ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS B EN CULTIVO CON IL-2 e IL-2 + PDB: 7 DÍAS DE CULTIVO/500.000 CÉLULAS POR POCILLO

Pacientes n=14	IL-2: 10 U/ml	IL-2: 100 U/ml	PDB + IL-2: 10 U/ml	PDB + IL-2: 100 U/ml
CD25 < 20% n=3	0.62 ± 0.48* (0.16-1.12)	1.67 ± 1.93 (0.17 - 3.85)	0.48 ± 0.34 (0.17 - 0.84)	0.52 ± 0.38 (0.26 - 0.96)
CD25 ≥ 20% n=11	5.06 ± 6.63 (1.04 - 21.69)	22.04 ± 42.24 (0.96 - 133.17)	3.21 ± 3.17 (0.22 - 10.30)	14.24 ± 28.50 (0.14 - 88.84)

* Media ± D.S. (rango).

4.2.a.1. Empleo de la IL-2 de forma aislada

La media de los índices de proliferación para la IL-2 exógena empleada a la dosis de 10 U/ml fue de 0.95 ± 0.50 (rango: 0.35 - 1.99; mediana: 0.82), y cuando se usó a dosis de 100 U/ml fue de 2.40 ± 2.55 (rango: 0.87 - 10.48; mediana: 1.48) ($p < 0.05$).

4.2.a.2. Empleo de la IL-2 en asociación al PDB

Al utilizar la IL-2 exógena a la dosis de 10 U/ml en combinación con el éster del forbol, la media de los índices de proliferación fue de 1.12 ± 1.56 (rango: 0.20 - 5.85; mediana: 0.62), y de 6.04 ± 17.86 (rango: 0.21 - 65.25; mediana: 0.66) al emplear la IL-2 a la dosis de 100 U/ml en asociación al PDB (n.s.).

En resumen, y al igual que se observó cuando el experimento se llevó a cabo con una duración de tres días, existió diferencia significativa entre el uso de la IL-2, de forma aislada, a la dosis de 100 U/ml y a la de 10 U/ml. Además, la combinación de la IL-2 con el éster del forbol no tuvo un efecto positivo sobre la proliferación celular leucémica. Por último, la asociación de ambos mitógenos no llevó consigo un aumento en los valores de los índices de proliferación con respecto al empleo de la IL-2 de forma aislada, aunque sí existió diferencia significativa ($p < 0.05$) en el empleo de la IL-2 a la dosis de 100 U/ml, sola y en asociación al PDB. Estos resultados derivan de los datos obtenidos de las medianas de los índices de proliferación, más valorables que las cifras de las medias, debido al elevado valor de la desviación típica (Tabla 14).

4.2.b. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días con 500.000 células por pocillo

En este análisis se incluyeron quince muestras de linfocitos B purificados. Al igual que en los experimentos previos, se empleó la IL-2, sola o en combinación con el éster del forbol, a las dosis de 10 U/ml y 100 U/ml (Tabla 14).

4.2.b.1. Empleo de la IL-2 de forma aislada

La media de los índices de proliferación para la IL-2 exógena empleada a la dosis de 10 U/ml fue de 3.55 ± 5.62 (rango: 0.16 - 21.69; mediana: 1.69), y cuando se usó a la dosis de 100 U/ml fue de 15.91 ± 35.81 (rango: 0.17 - 133.17; mediana: 4.24) ($p < 0.05$).

4.2.b.2. Empleo de la IL-2 en asociación al PDB

Al utilizar la IL-2 recombinante a la dosis de 10 U/ml, en combinación con el éster del forbol, la media de los índices de proliferación fue de 2.62 ± 2.77 (rango: 0.17 - 10.30; mediana: 2.11), y de 10.62 ± 24.46 (rango: 0.14 - 88.84; mediana: 1.48) al emplear la IL-2 a la dosis de 100 U/ml en asociación al PDB (n.s.).

En conclusión, la IL-2 exógena a la dosis de 100 U/ml, estimula la proliferación de los linfocitos B purificados, cuando se emplea de forma aislada, a diferencia de lo que ocurre cuando se utiliza a la dosis de 10 U/ml ($p < 0.05$). Asimismo, la IL-2 a la dosis de 10 U/ml en combinación con el éster del forbol tuvo un efecto positivo sobre la respuesta proliferativa. Por último, existió diferencia significativa en el empleo de la IL-2 de forma aislada, con ambas dosis utilizadas, y con la asociación de la citocina al PDB ($p < 0.05$). De la misma manera que en los análisis previos, se escogió el valor de la mediana de los índices de proliferación, por ser la cifra de la desviación típica muy elevada (Tabla 14).

4.2.b.3. Influencia de la expresión del antígeno CD25 en la proliferación celular leucémica a la IL-2, empleada sola o en combinación con el PDB

En catorce de las quince muestras estudiadas se determinó la expresión del antígeno de activación CD25. Tres de ellas presentaban el CD25 en un porcentaje inferior o igual al 15% (0, 0, 10%) y en las once muestras restantes la expresión de dicho antígeno de membrana era superior o igual al 20%.

El valor de la media de los índices de proliferación, al emplear la IL-2 recombinante a 10 U/ml y 100 U/ml, tanto de forma aislada como en asociación al éster del forbol, fue inferior en los pacientes que expresaban el antígeno CD25 en

un porcentaje igual o inferior al 15%, que en las once muestras de linfocitos B purificados cuya expresión del CD25 era superior o igual al 20%. Esto era cierto al emplear la IL-2 recombinante a 10 U/ml y 100 U/ml, tanto de forma aislada como en asociación al éster del forbol (Tabla 16). Sin embargo, sólo la utilización de la IL-2 de forma aislada y a la dosis de 10 U/ml llevó consigo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

5. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS A LA IL-6 EXÓGENA:

Se realizaron estudios de proliferación con una duración de tres y siete días. Se analizó la acción de la IL-6, sola o en combinación con otros mitógenos, sobre la proliferación de los linfocitos B leucemicos.

5.1. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a tres días

Con las treinta y nueve muestras de células leucémicas purificadas se realizó un estudio de proliferación, con una duración de tres días y utilizando una concentración celular de 100.000 células por pocillo (Tabla 17; Figuras 10 y 13).

5.1.a. Empleo de la interleucina 6 de forma aislada

El análisis incluyó las treinta muestras con un buen grado de purificación, en las que se llevó a cabo el estudio. En este experimento la IL-6 exógena no hizo proliferar las células leucémicas en ninguna de las dieciséis dosis utilizadas (20 ng/ml a 0.625 pg/ml). Los índices de proliferación no fueron superiores a 2.00 en ningún caso. No se observó una relación lineal dosis de IL-6/respuesta proliferativa (Tabla 17).

Tampoco se objetivó una inhibición de la proliferación de las células leucémicas por la IL-6 recombinante en las dosis empleadas, pues la media de los índices de proliferación no fue inferior a 0.50 para ninguna de las dosis de IL-6 empleadas. Todos los valores de las medias de los índices de proliferación con las diferentes dosis de IL-6 eran inferiores a 1.00. Estas cifras oscilaron entre 0.56 ± 0.14 (rango: 0.31 - 0.82; para la dosis de IL-6 de 2.5 ng/ml) y 0.83 ± 0.54 (rango: 0.25 - 2.44; para la dosis de IL-6 de 625 pg/ml) ($p < 0.05$).

Las cifras de las medianas de los índices de proliferación estaban comprendidos entre 0.53 (con 2.5 ng/ml de IL-6) y 0.81 (con 5 ng/ml de IL-6). Con todas las dosis de IL-6 exógena empleada existía un 25% de pacientes con índices de proliferación inferior a 0.50, y un 75% de los mismos con índices inferiores a 1.09.

5.1.b. Empleo de la IL-6 en asociación con el PDB

En este apartado se detallan los resultados obtenidos en el estudio de proliferación celular de los linfocitos B leucémicos cuando se emplearon, de forma conjunta, la IL-6 en sus diferentes dosis (20 ng/ml a 0.625 pg/ml) y el PDB. En conjunto se analizaron treinta muestras, las mismas incluidas en el experimento anterior.

La combinación de ambos mitógenos no estimuló la proliferación de las células leucémicas purificadas, a ninguna de las dieciseis dosis de IL-6 utilizadas (20 ng/ml a 0.625 pg/ml). Los índices de proliferación no fueron superiores a 2.00 en ningún caso. No se observó una relación lineal dosis de IL-6/respuesta proliferativa, aunque sí se objetivó diferencia significativa (ANOVA con $p < 0.05$) entre las tres primeras dosis (20 ng/ml, 10 ng/ml y 5 ng/ml) y el resto de las dosis de IL-6 empleadas. Tampoco se objetivó inhibición de la proliferación por la combinación de IL-6 recombinante y PDB.

Las medias de los índices de proliferación de las diferentes dosis de IL-6 asociadas al PDB oscilaron entre 0.60 ± 0.34 (rango: 0.18 - 1.75; para la dosis de IL-6 de 20 ng/ml) y 1.26 ± 1.34 (rango: 0.18 - 7.22; para la dosis de IL-6 de 0.625 pg/ml) ($p < 0.05$). Las medias de dichos índices estaban incluidas entre 0.93 ± 0.49 y 1.09 ± 0.66 para el abanico de dosis de IL-6 -en combinación con el PDB- comprendidas entre 2.5 ng/ml y 1.25 pg/ml, por lo que la respuesta

TABLA 17. ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS B EN CULTIVO CON IL-6

Dosis de IL-6	3 días; 100.000 células/pocillo	7 días; 100.000 células/pocillo	7 días; 500.000 células/pocillo
20 ng/ml	0.67 ± 0.28* (0.13 - 1.51)	0.85 ± 0.53 (0.32 - 2.13)	0.28 ± 0.22 (0.02 - 0.81)
10 ng/ml	0.65 ± 0.27 (0.19 - 1.28)	0.86 ± 0.45 (0.30 - 1.89)	0.39 ± 0.25 (0.02 - 0.88)
5 ng/ml	0.71 ± 0.26 (0.28 - 1.07)	0.80 ± 0.26 (0.36 - 1.30)	0.45 ± 0.27 (0.07 - 0.93)
2.5 ng/ml	0.56 ± 0.14 (0.31 - 0.82)	0.79 ± 0.34 (0.35 - 1.47)	0.47 ± 0.30 (0.09 - 1.03)
1.25 ng/ml	0.79 ± 0.39 (0.23 - 1.87)	1.03 ± 0.49 (0.42 - 1.97)	0.68 ± 0.43 (0.01 - 1.66)
625 pg/ml	0.83 ± 0.54 (0.25 - 2.44)	0.92 ± 0.37 (0.41 - 1.69)	0.78 ± 0.41 (0.03 - 1.67)
312 pg/ml	0.69 ± 0.46 (0.27 - 2.15)	0.68 ± 0.35 (0.25 - 1.53)	0.67 ± 0.35 (0.05 - 1.16)
156 pg/ml	0.67 ± 0.32 (0.19 - 1.71)	0.75 ± 0.34 (0.28 - 1.52)	0.71 ± 0.27 (0.26 - 1.38)
80 pg/ml	0.71 ± 0.34 (0.19 - 1.54)	0.75 ± 0.32 (0.17 - 1.52)	0.70 ± 0.32 (0.09 - 1.26)
40 pg/ml	0.75 ± 0.56 (0.14 - 2.84)	0.67 ± 0.31 (0.17 - 1.23)	0.70 ± 0.36 (0.09 - 1.46)
20 pg/ml	0.67 ± 0.30 (0.15 - 1.45)	0.76 ± 0.33 (0.29 - 1.40)	0.76 ± 0.36 (0.14 - 1.50)
10 pg/ml	0.76 ± 0.65 (0.11 - 3.55)	0.91 ± 0.42 (0.28 - 1.71)	0.81 ± 0.32 (0.16 - 1.48)
5 pg/ml	0.63 ± 0.54 (0.09 - 3.08)	0.69 ± 0.35 (0.20 - 1.34)	0.78 ± 0.31 (0.14 - 1.22)
2.5 pg/ml	0.61 ± 0.27 (0.06 - 1.13)	0.79 ± 0.34 (0.34 - 1.78)	0.71 ± 0.32 (0.13 - 1.17)
1.25 pg/ml	0.70 ± 0.51 (0.05 - 2.70)	0.75 ± 0.43 (0.28 - 1.86)	0.66 ± 0.32 (0.09 - 1.18)
0.625 pg/ml	0.70 ± 0.54 (0.12 - 2.74)	0.60 ± 0.23 (0.19 - 1.01)	0.88 ± 1.04 (0.10 - 4.59)

* Media ± D.S. (Rango).

TABLA 18. ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS B EN CULTIVO CON IL-6 + PDB

Dosis de IL-6 + PDB	3 días; 100.000 células/pocillo	7 días; 100.000 células/pocillo	7 días; 500.000 células/pocillo
20 ng/ml	0.60 ± 0.34* (0.18 - 1.75)	0.69 ± 0.44 (0.22 - 1.90)	0.56 ± 0.92 (0.03 - 4.28)
10 ng/ml	0.74 ± 0.39 (0.23 - 1.61)	0.97 ± 0.84 (0.26 - 3.86)	0.72 ± 1.25 (0.02 - 5.84)
5 ng/ml	0.84 ± 0.58 (0.18 - 2.34)	1.61 ± 1.90 (0.37 - 7.99)	0.59 ± 0.36 (0.13 - 1.48)
2.5 ng/ml	1.03 ± 0.68 (0.16 - 2.98)	1.01 ± 0.95 (0.34 - 3.90)	0.96 ± 0.92 (0.13 - 3.93)
1.25 ng/ml	1.08 ± 0.85 (0.26 - 4.38)	1.09 ± 0.59 (0.43 - 2.98)	1.27 ± 1.26 (0.01 - 5.20)
625 pg/ml	1.02 ± 0.69 (0.21 - 3.72)	1.19 ± 1.08 (0.29 - 4.95)	1.59 ± 1.91 (0.35 - 7.78)
312 pg/ml	1.07 ± 0.80 (0.26 - 3.69)	1.03 ± 1.38 (0.23 - 6.23)	1.14 ± 0.79 (0.16 - 3.03)
156 pg/ml	0.93 ± 0.61 (0.32 - 2.72)	1.14 ± 1.01 (0.37 - 4.48)	1.23 ± 0.90 (0.22 - 3.57)
80 pg/ml	1.01 ± 0.59 (0.24 - 2.79)	1.01 ± 0.89 (0.32 - 3.93)	1.08 ± 0.69 (0.18 - 2.51)
40 pg/ml	1.09 ± 0.66 (0.19 - 2.94)	0.89 ± 0.82 (0.31 - 3.87)	1.20 ± 0.72 (0.27 - 2.87)
20 pg/ml	0.97 ± 0.55 (0.24 - 2.04)	1.25 ± 1.11 (0.17 - 4.85)	1.21 ± 0.72 (0.39 - 3.14)
10 pg/ml	1.03 ± 0.58 (0.22 - 2.38)	1.17 ± 0.87 (0.37 - 3.97)	1.19 ± 0.73 (0.34 - 3.10)
5 pg/ml	1.02 ± 0.53 (0.20 - 2.23)	0.95 ± 1.09 (0.25 - 4.37)	1.14 ± 0.71 (0.33 - 2.82)
2.5 pg/ml	1.05 ± 0.77 (0.27 - 3.72)	1.17 ± 1.06 (0.33 - 3.97)	1.16 ± 0.89 (0.14 - 3.32)
1.25 pg/ml	0.93 ± 0.49 (0.35 - 2.00)	1.07 ± 0.93 (0.44 - 3.99)	1.53 ± 2.05 (0.15 - 8.66)
0.625 pg/ml	1.26 ± 1.34 (0.18 - 7.22)	0.85 ± 0.74 (0.23 - 3.04)	1.85 ± 2.92 (0.16 - 12.02)

* Media ± D.S. (Rango).

proliferativa de las células leucémicas a esa combinación de mitógenos se puede considerar nula (índice de proliferación alrededor de 1.00) (Tabla 18).

Asimismo, las medianas de los índices de proliferación estaban comprendidos entre 0.56 (para la dosis de IL-6 de 20 ng/ml con el PDB) y 0.99 (para la dosis de IL-6 de 20 pg/ml con el PDB). Con las dosis de IL-6 de 20 ng/ml a 2.5 ng/ml -asociadas al PDB- existía un 25% de pacientes con índices de proliferación inferior a 0.50. Con todas las dosis de IL-6 empleadas en combinación con el éster del forbol existía un 10% de pacientes con índices de proliferación inferior a 0.50.

En relación al uso de las dosis de IL-6 de forma aislada, la combinación de la citocina con el PDB estimuló la proliferación de las células B leucémicas de forma significativa, respecto al empleo de la IL-6 sola, con las dosis de 2.5 ng/ml, y a partir de la de 312 pg/ml hasta la última de 0.625 pg/ml ($p < 0.05$) (Figura 14).

5.1.c. Empleo de la IL-6 en asociación con SAC₂

En dieciséis pacientes se realizó el estudio de la respuesta proliferativa de las células B leucémicas cuando se había añadido al medio de cultivo la IL-6 recombinante y el activador policlonal de los linfocitos B SAC₂. Las doce dosis de IL-6 empleadas estuvieron comprendidas entre 1.25 ng/ml a 0.625 pg/ml. La concentración celular fue de 100.000 células por pocillo de la placa de proliferación.

La combinación de ambos mitógenos no sirvió de estímulo de proliferación a las células leucémicas purificadas, en ninguna de las dosis de IL-6 utilizadas. Los índices de proliferación no fueron superiores a 2.00 en ningún caso. No se observó una relación lineal dosis de IL-6/respuesta proliferativa.

Las medias de los índices de proliferación de las diferentes dosis de IL-6 asociadas al SAC₂ oscilaron entre 0.80 ± 0.44 (rango: 0.21 - 1.65; para la dosis de IL-6 de 312 pg/ml) y 1.38 ± 1.35 (rango: 0.11 - 5.74; para la dosis de IL-6 de 0.625 pg/ml) ($p < 0.05$) (Tabla 19).

Asimismo, las medianas de los índices de proliferación estaban comprendidos entre 0.55 (para la dosis de IL-6 de 5 pg/ml con el SAC₂) y 1.10 (para la dosis de IL-6 de 40 pg/ml con el SAC₂). Aunque no se objetivó inhibición de la proliferación por la combinación de IL-6 recombinante y SAC₂,

* p < 0.05

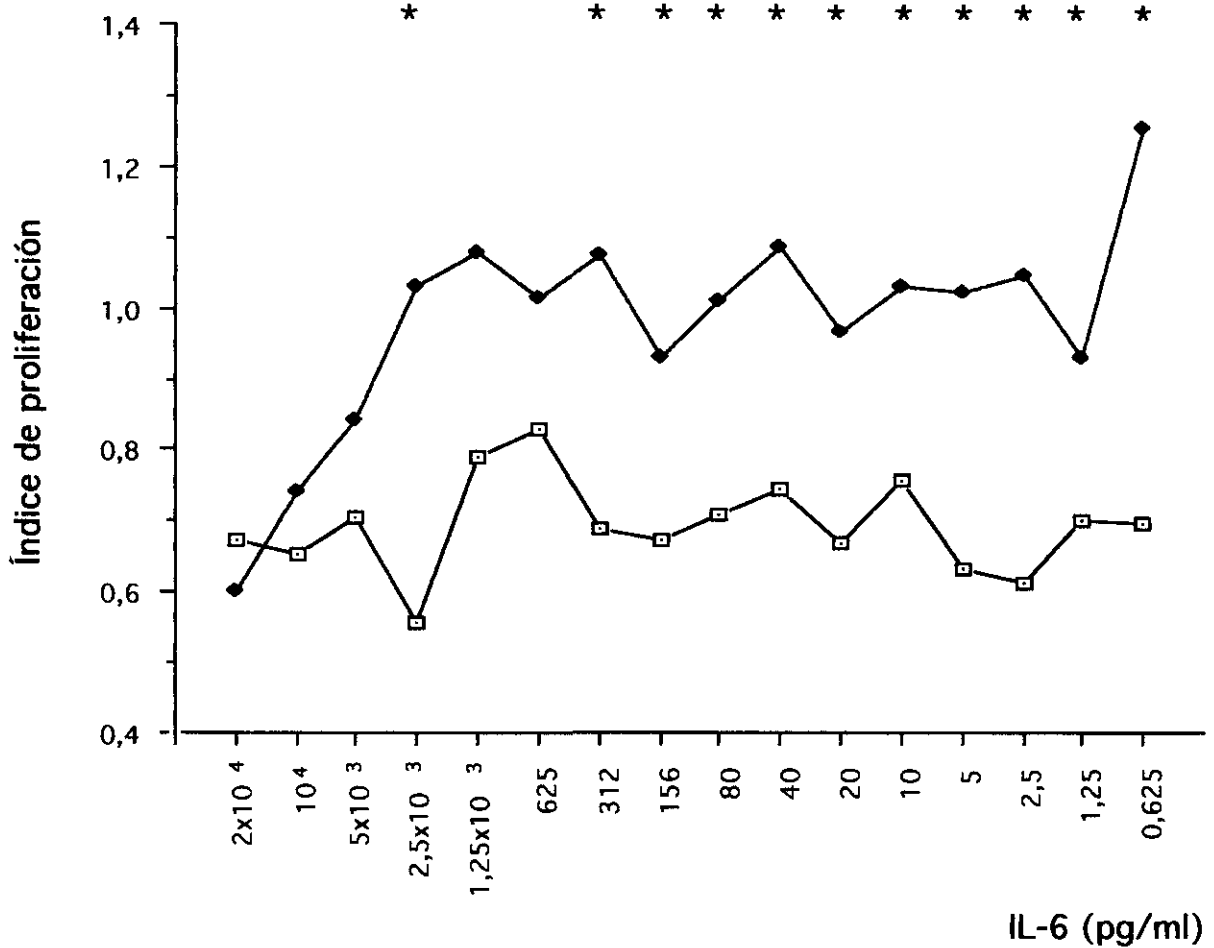


FIGURA 14. Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 y a la combinación de la IL-6 y el PDB. Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo.

—□— IL-6

—◆— IL-6 + PDB

TABLA 19. ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS B EN CULTIVO CON IL-6, SAC₂ Y PDB. TRES DÍAS DE CULTIVO/100.000 CÉLULAS POR POCILLO

Dosis de IL-6	IL-6	IL-6 + SAC ₂	IL-6 + PDB	IL-6 + PDB+ SAC ₂
20 ng/ml	0.67 ± 0.28* (0.13 - 1.51)	-	0.60 ± 0.34 (0.18 - 1.75)	-
10 ng/ml	0.65 ± 0.27 (0.19 - 1.28)	-	0.74 ± 0.39 (0.23 - 1.61)	-
5 ng/ml	0.71 ± 0.26 (0.28 - 1.07)	-	0.84 ± 0.58 (0.18 - 2.34)	-
2.5 ng/ml	0.56 ± 0.14 (0.31 - 0.82)	-	1.03 ± 0.68 (0.16 - 2.98)	-
1.25 ng/ml	0.79 ± 0.39 (0.23 - 1.87)	0.85 ± 0.48 (0.30 - 1.93)	1.08 ± 0.85 (0.26 - 4.38)	1.83 ± 2.60 (0.25 - 8.70)
625 pg/ml	0.83 ± 0.54 (0.25 - 2.44)	0.97 ± 0.54 (0.23 - 2.25)	1.02 ± 0.69 (0.21 - 3.72)	2.05 ± 2.58 (0.23 - 8.29)
312 pg/ml	0.69 ± 0.46 (0.27 - 2.15)	0.80 ± 0.44 (0.21 - 1.65)	1.07 ± 0.80 (0.26 - 3.69)	1.88 ± 2.62 (0.11 - 8.78)
156 pg/ml	0.67 ± 0.32 (0.19 - 1.71)	0.92 ± 0.49 (0.17 - 2.11)	0.93 ± 0.61 (0.32 - 2.72)	2.16 ± 3.00 (0.21 - 10.62)
80 pg/ml	0.71 ± 0.34 (0.19 - 1.54)	1.10 ± 0.72 (0.31 - 2.51)	1.01 ± 0.59 (0.24 - 2.79)	1.80 ± 2.53 (0.18 - 8.81)
40 pg/ml	0.75 ± 0.56 (0.14 - 2.84)	1.26 ± 0.98 (0.17 - 3.49)	1.09 ± 0.66 (0.19 - 2.94)	2.06 ± 2.81 (0.21 - 10.32)
20 pg/ml	0.67 ± 0.30 (0.15 - 1.45)	0.86 ± 0.62 (0.07 - 2.15)	0.97 ± 0.55 (0.24 - 2.04)	1.96 ± 2.81 (0.26 - 10.21)
10 pg/ml	0.76 ± 0.65 (0.11 - 3.55)	1.01 ± 0.83 (0.12 - 2.96)	1.03 ± 0.58 (0.22 - 2.38)	1.75 ± 2.46 (0.17 - 9.57)
5 pg/ml	0.63 ± 0.54 (0.09 - 3.08)	0.84 ± 0.79 (0.10 - 2.66)	1.02 ± 0.53 (0.20 - 2.23)	1.72 ± 2.18 (0.10 - 7.88)
2.5 pg/ml	0.61 ± 0.27 (0.06 - 1.13)	1.11 ± 1.06 (0.08 - 2.99)	1.05 ± 0.77 (0.27 - 3.72)	1.67 ± 2.44 (0.06 - 9.17)
1.25 pg/ml	0.70 ± 0.51 (0.05 - 2.70)	0.91 ± 0.69 (0.12 - 2.12)	0.93 ± 0.49 (0.35 - 2.00)	1.53 ± 1.60 (0.15 - 5.18)
0.625 pg/ml	0.70 ± 0.54 (0.12 - 2.74)	1.38 ± 1.35 (0.11 - 5.74)	1.26 ± 1.34 (0.18 - 7.22)	2.26 ± 2.87 (0.20 - 9.64)

* Media ± D.S. (Rango).

al constatar que las medias de los índices de proliferación estaban por encima del valor de 0.50, se observó que con todas las dosis de IL-6 empleadas en combinación con el SAC₂ existía un 10% de pacientes con índices de proliferación inferior a 0.50.

Cuando se compararon las diferentes dosis de IL-6, empleadas de forma aislada, con la asociación de la citocina al SAC₂, no se observó un efecto significativo sobre la proliferación celular leucémica para ninguna de las dosis de IL-6 empleadas (Figura 15).

5.1.d. Empleo de la IL-6 en asociación con PDB y SAC₂

En las dieciséis muestras del apartado 5.1.c se realizó el estudio de la respuesta proliferativa de las células B leucémicas cuando se había añadido al medio de cultivo la IL-6 recombinante, el éster del forbol y el SAC₂. Las dosis de IL-6 empleadas estuvieron también comprendidas entre 1.25 ng/ml a 0.625 pg/ml. La concentración celular fue igualmente de 100.000 células por pocillo.

La asociación de los tres mitógenos estimuló la respuesta proliferativa de las células leucémicas purificadas, en cuatro de las dosis de IL-6 utilizadas. Así, los índices de proliferación fueron superiores a 2.00 al emplear la IL-6 a la dosis de 625 pg/ml (2.05), 156 pg/ml (2.16), 40 pg/ml (2.06) y 0.625 pg/ml (2.26). No se observó una relación lineal dosis de IL-6/respuesta proliferativa.

Los valores de las medias de los índices de proliferación estaban comprendidos entre 1.53 (con 1.25 pg/ml de IL-6) y 2.26 (con 0.625 pg/ml de IL-6) ($p < 0.05$) (Tabla 19).

Todos los valores de las medianas de los índices de proliferación estuvieron por debajo de 1.29 y comprendidos entre 0.66 -con 2.5 pg/ml de IL-6- y 1.29 -con 40 pg/ml de IL-6-. Aunque no se objetivó inhibición de la proliferación por la combinación de los tres mitógenos empleados, al constatar que las medias de los índices de proliferación estaban por encima del valor de 0.50, se observó que con todas las dosis de IL-6 empleadas en combinación con el PDB y el SAC₂ existía un 10% de pacientes con índices de proliferación inferior a 0.50.

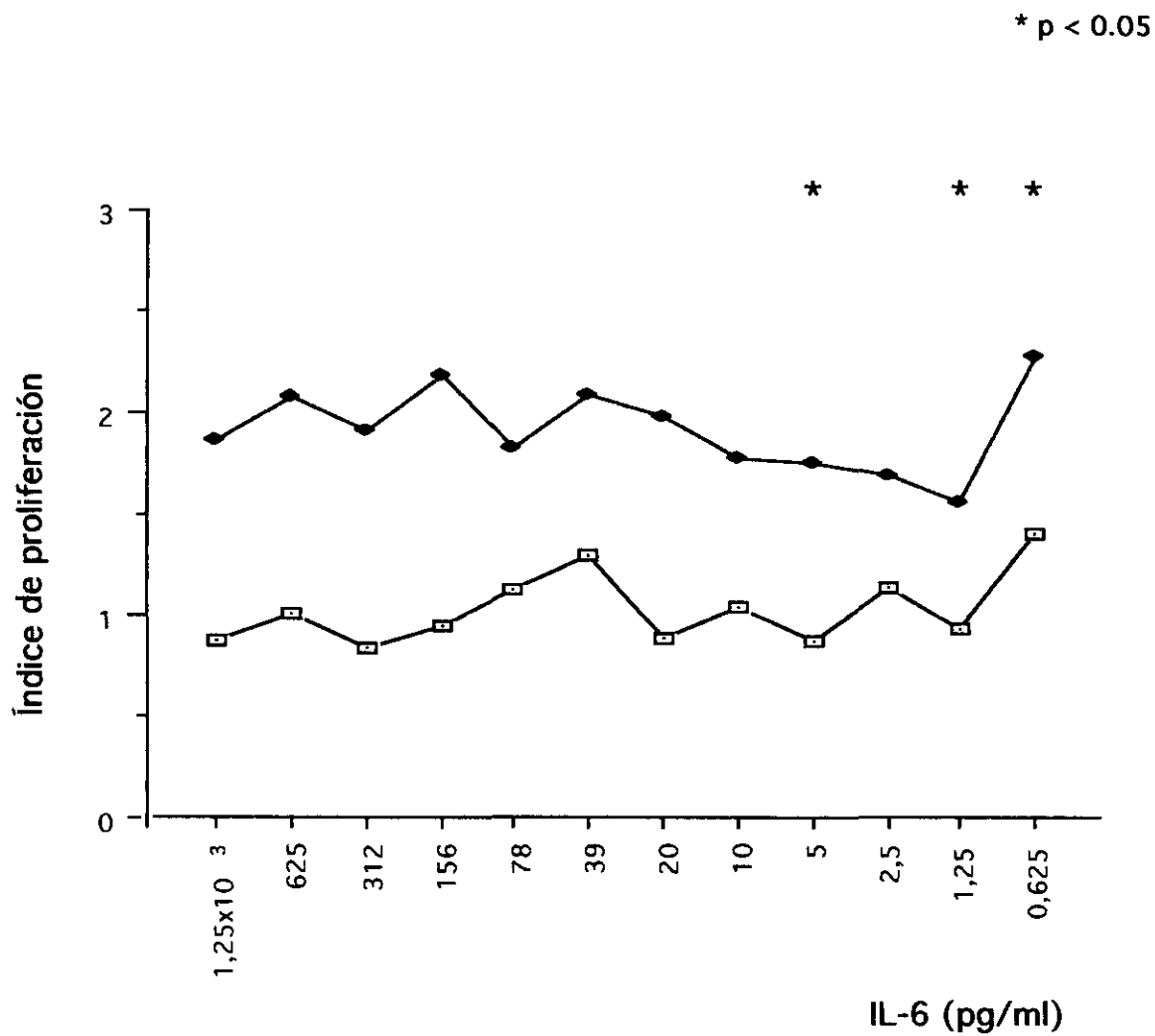


FIGURA 16. Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 + SAC y a la combinación de la IL-6, el SAC y el PDB. Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo.

—□— IL-6 + SAC —●— IL-6 + PDB + SAC

Al comparar las diferentes dosis de IL-6 + SAC₂, en ausencia y en presencia del éster del forbol, se observó diferencia significativa en los índices de proliferación para las dosis de 5 pg/ml, 1.25 pg/ml y 0.625 pg/ml ($p < 0.05$) (Figura 16).

Cuando se analizó de forma comparativa las distintas dosis de IL-6 + PDB, con o sin la combinación del SAC₂, no se objetivó diferencia significativa en ninguno de los índices de proliferación obtenidos (Figura 17).

5.2. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días

Se diseñaron dos tipos de experimentos con una duración de los cultivos de siete días. En el primero de ellos se empleó una concentración de 100.000 células por pocillo, mientras que el segundo se llevó a cabo utilizando una concentración de 500.000 células por pocillo.

5.2.a. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días con 100.000 células por pocillo

En veinte muestras de linfocitos B purificados se realizó un estudio de proliferación con una duración de siete días y una concentración de 100.000 células por pocillo de la placa de proliferación. Tres de esas muestras se eliminaron del análisis por contar con una población de linfocitos T y/o de monocitos superior al 5% después de haber llevado a cabo la técnica de selección negativa con hematíes de oveja tratados con AET. Al final, el estudio incluyó diecisiete pacientes. En los cultivos celulares se empleó la IL-6 exógena recombinante, de forma aislada o en combinación con el éster del forbol (PDB).

5.2.a.1. Empleo de la IL-6 de forma aislada

En este experimento la IL-6 exógena no hizo proliferar las células leucémicas en ninguna de las dosis utilizadas (20 ng/ml a 0.625 pg/ml). Los índices de

proliferación no fueron superiores a 2.00 en ningún caso. No se observó una *relación lineal dosis de IL-6/respuesta proliferativa*.

Todos los valores de las medias de los índices de proliferación de las diferentes dosis de IL-6 eran inferiores a 1.03, oscilando entre 0.60 ± 0.23 (rango: 0.19 - 1.01; para la dosis de IL-6 de 0.625 pg/ml) y 1.03 ± 0.49 (rango: 0.42 - 1.97; para la dosis de IL-6 de 1.25 ng/ml) ($p < 0.05$) (Tabla 17).

Las cifras de las medianas de los índices de proliferación estaban comprendidos entre 0.60 (con 40 y 5 pg/ml de IL-6) y 0.94 (con 10 pg/ml de IL-6). Aunque no se objetivó, en conjunto, una inhibición de la proliferación por la IL-6 recombinante en las dosis empleadas, sí se observó que con todas las dosis de IL-6 exógena empleada existía un 10% de pacientes con índices de proliferación inferior a 0.50.

5.2.a.2. Empleo de la IL-6 en asociación con el PDB

En este apartado se detallan los resultados obtenidos en el estudio de proliferación celular de los linfocitos B leucémicos cuando se emplearon, de forma conjunta, la IL-6 en sus diferentes dosis (20 ng/ml a 0.625 pg/ml) y el PDB. Se analizaron los datos de las mismas muestras incluidas en el experimento detallado en el apartado 5.2.a.

La combinación de ambos mitógenos no sirvió de estímulo de proliferación a las células leucémicas purificadas, en ninguna de las dosis de IL-6 utilizadas (20 ng/ml a 0.625 pg/ml). Los índices de proliferación no fueron superiores a 2.00 en ningún caso. No se observó una *relación lineal dosis de IL-6/respuesta*. Tampoco se objetivó inhibición de la proliferación por la combinación de IL-6 recombinante y PDB.

Las medias de los índices de proliferación de las diferentes dosis de IL-6 asociadas al PDB oscilaron entre 0.69 ± 0.44 (rango: 0.22 - 1.90; para la dosis de IL-6 de 20 ng/ml) y 1.61 ± 1.90 (rango: 0.37 - 7.99; para la dosis de IL-6 de 5 ng/ml) ($p < 0.05$) (Tabla 18).

Asimismo, las medianas de los índices de proliferación estaban comprendidos entre 0.55 (para la dosis de IL-6 de 5 pg/ml con el PDB) y 1.10 (para la dosis de IL-6 de 5 ng/ml con el PDB). Con todas las dosis de IL-6 empleadas en combinación con el éster del forbol existía un 10% de pacientes con índices de proliferación inferior a 0.54.

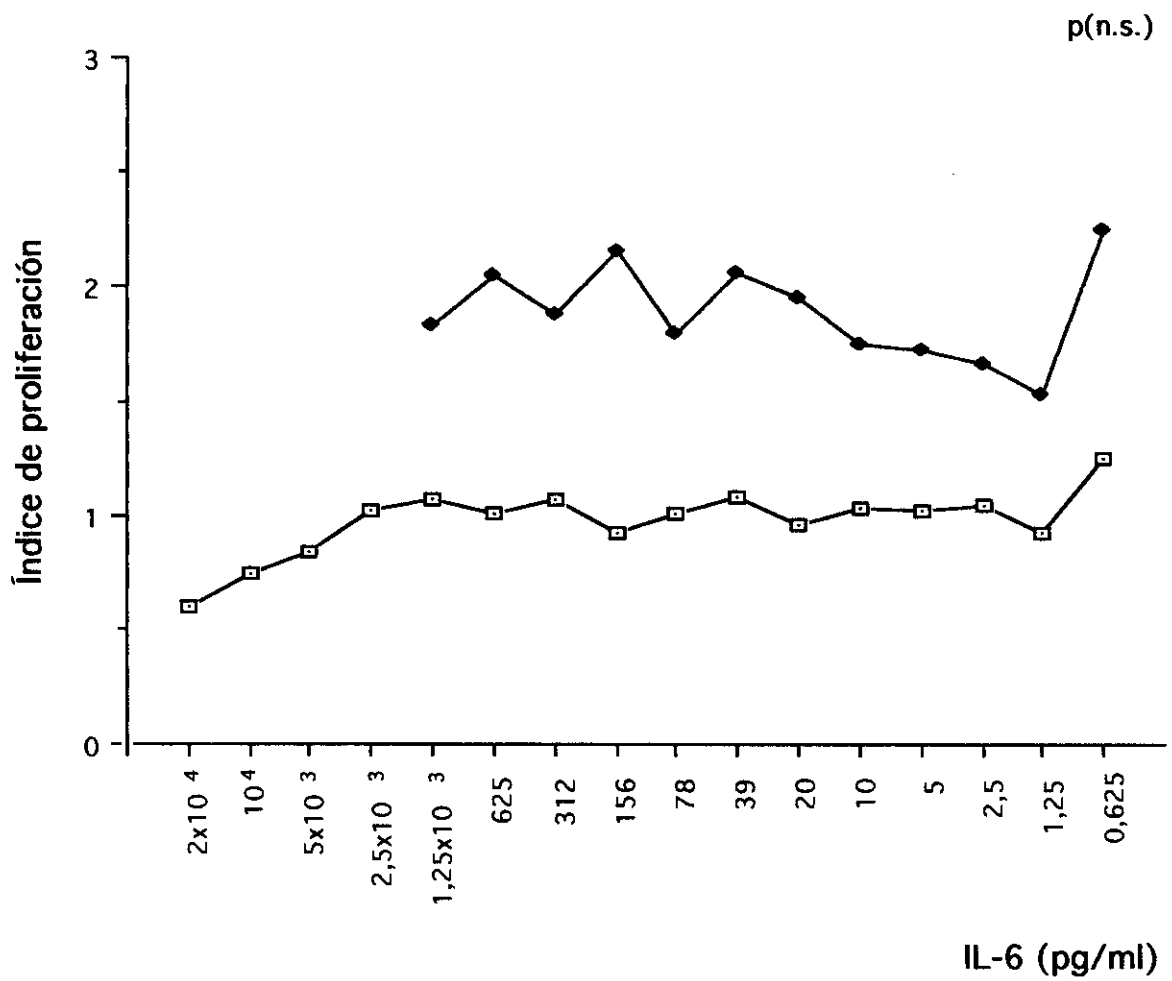


FIGURA 17. Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 + PDB y a la combinación de la IL-6, el PDB y el SAC. Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo.

—□— IL-6 + PDB —●— IL-6 + PDB + SAC

Al analizar de forma comparativa los índices de proliferación de las células B leucémicas en contacto con la IL-6, sin o con la presencia añadida del PDB, se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) únicamente con la dosis de IL-6 de 5 ng/ml (Figura 18).

5.2.b. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días con 500.000 células por pocillo

En veintitrés muestras de linfocitos B purificados se realizó un estudio de proliferación con una duración de siete días y una concentración de 500.000 células por pocillo de la placa de proliferación. Dos de esas muestras se eliminaron del análisis por contar con una población de linfocitos T y/o de monocitos superior al 5% después de haber llevado a cabo la técnica de selección negativa con hematíes de oveja tratados con AET. Al final, el estudio incluyó veintiún pacientes. En los cultivos celulares se empleó la IL-6 exógena recombinante, de forma aislada o en combinación con el éster del forbol (PDB). La IL-6 recombinante se añadió al cultivo en una variedad de dosis comprendidas entre 20 ng/ml y 0.625 pg/ml.

5.2.b.1. Empleo de la IL-6 de forma aislada

En este experimento la IL-6 exógena no hizo proliferar las células leucémicas en ninguna de las dosis utilizadas. Los índices de proliferación no fueron superiores a 1.00 en ningún caso. No se observó una relación lineal dosis de IL-6/respuesta proliferativa, aunque sí existió diferencia significativa (ANOVA con $p < 0.05$) entre las cuatro primeras dosis de citocina (20 ng/ml a 2.5 ng/ml) y el resto de las dosis de IL-6 usadas (1.25 ng/ml a 0.625 pg/ml). Sí se objetivó una inhibición de la proliferación por la IL-6 recombinante con cuatro de las dosis de IL-6 empleadas (20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2.5 ng/ml), puesto que las medias de los índices de proliferación para esas dosis fueron inferiores a 0.50 (0.28 ± 0.22 , 0.39 ± 0.25 , 0.45 ± 0.27 y 0.47 ± 0.30 respectivamente).

Los valores de las medias de los índices de proliferación de las diferentes dosis de IL-6 oscilaron entre 0.28 ± 0.22 (rango: 0.02 - 0.81; para la dosis de IL-6 de 20 ng/ml) y 0.88 ± 1.04 (rango: 0.10 - 4.59; para la dosis de IL-6 de 0.625 pg/ml) ($p < 0.05$) (Tabla 17).

Las cifras de las medianas de los índices de proliferación estaban comprendidos entre 0.20 (con 20 ng/ml de IL-6) y 0.83 (con 40 y 10 pg/ml de IL-6). Con todas las dosis de IL-6 exógena empleada existía un 10% de pacientes con índices de proliferación inferior a 0.50, y un 25% de las mismas con índices inferiores a 0.61. En el caso concreto de la utilización de 20 ng/ml de IL-6, la mediana de los índices de proliferación era de 0.20, con un 75% de los pacientes con índices inferiores a 0.43, y un 90% por debajo de 0.57; al emplear una dosis de 10 ng/ml, dicha mediana era de 0.34, con el 75% de los enfermos con índices menores a 0.57; la mediana fue de 0.44 si se usaba 5 ng/ml de IL-6 en los cultivos, con un 75% de las muestras con índices por debajo de 0.76.

El grado de proliferación espontánea varió de unos pacientes a otros. Para aquellos incluidos en el grupo de riesgo bajo de la clasificación de Rai (estadio 0), el valor fue de 757 ± 452 cpm (rango: 173 - 1636); para las muestras del grupo de riesgo intermedio (estadios I y II) fue de 1628 ± 1793 cpm (rango: 228 - 6240).

5.2.b.2. Empleo de la IL-6 en asociación con el PDB

Se analizaron las mismas veintitrés muestras incluidas en el experimento detallado en el apartado anterior.

La combinación de ambos mitógenos no sirvió de estímulo de proliferación a las células leucémicas purificadas, en ninguna de las dosis de IL-6 utilizadas (20 ng/ml a 0.625 pg/ml), puesto que los índices de proliferación no fueron superiores a 2.00 en ningún caso. No se observó una relación lineal dosis de IL-6/respuesta proliferativa, pero sí una diferencia significativa (ANOVA con $p < 0.05$) entre las tres primeras dosis de IL-6 (20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml) y el resto de las dosis de la citocina empleadas. Tampoco se objetivó inhibición de la proliferación por la combinación de IL-6 recombinante y PDB.

Las medias de los índices de proliferación de las diferentes dosis de IL-6 asociadas al PDB oscilaron entre 0.58 ± 0.92 (rango: 0.03 - 4.28; para la dosis de IL-6 de 20 ng/ml) y 1.85 ± 2.92 (rango: 0.16 - 12.02; para la dosis de IL-6 de 0.625 pg/ml). Las medias de dichos valores fueron inferiores a 1.00 para las dosis de IL-6 entre 20 ng/ml y 2.5 ng/ml, y fueron superiores a ese valor para el resto de las dosis de la citocina (1.25 ng/ml a 0.625 pg/ml) ($p < 0.05$) (Tabla 18).

* p < 0.05

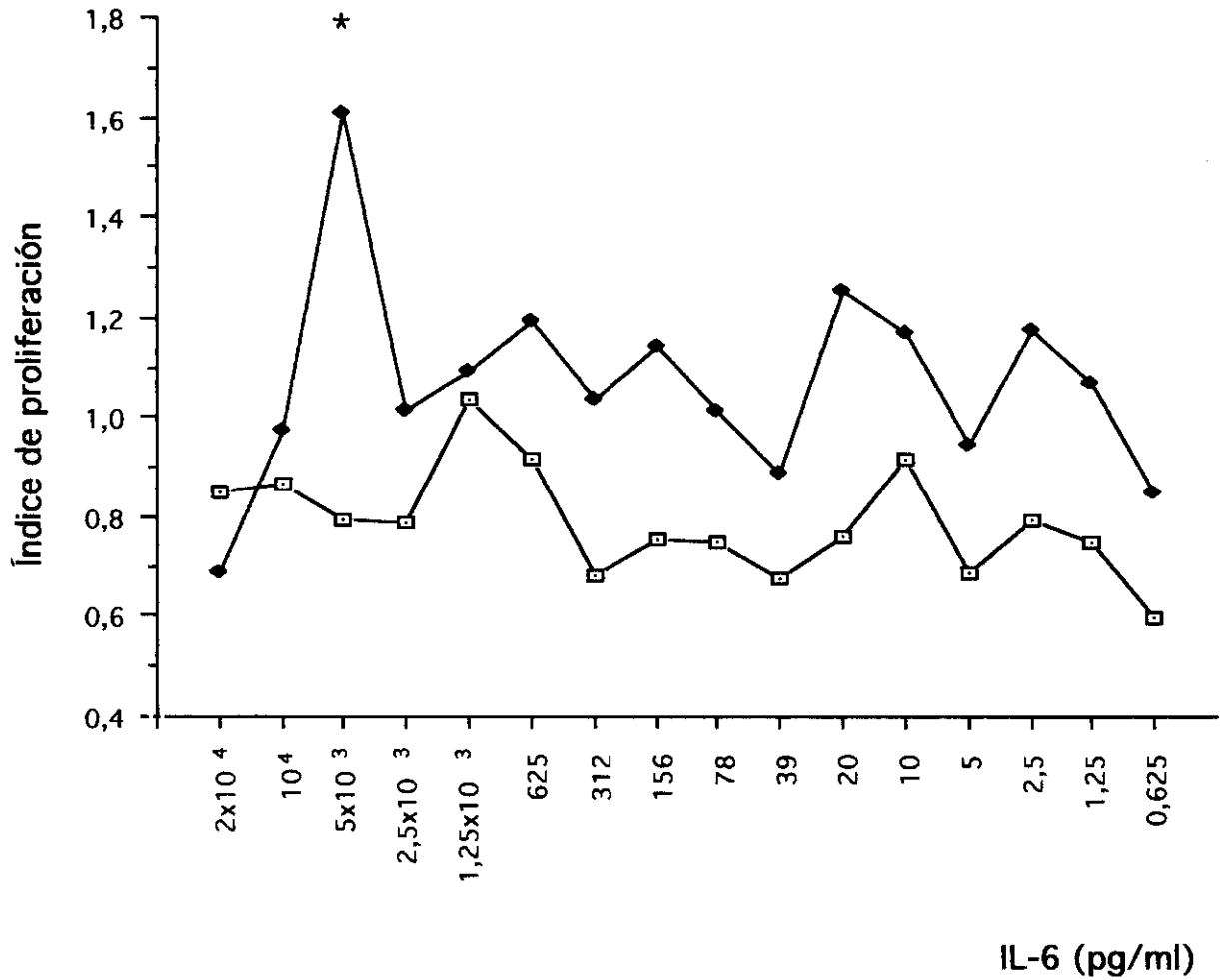


FIGURA 18. Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 y a la combinación de la IL-6 y el PDB. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo.

—□— IL-6

—●— IL-6 + PDB

Asímismo, las medianas de los índices de proliferación estaban comprendidas entre 0.22 (para la dosis de IL-6 de 20 ng/ml con el PDB) y 1.16 (para la dosis de IL-6 de 40 pg/ml con el PDB). Con todas las dosis de IL-6 empleadas en combinación con el éster del forbol existía un 10% de pacientes con índices de proliferación inferior a 0.59. Para todas las combinaciones de dosis de IL-6 con PDB, los valores de las medianas de los índices de proliferación fueron siempre superiores a los obtenidos cuando únicamente se empleó la IL-6 como mitógeno de forma aislada.

No se evidenció diferencia significativa en los índices de proliferación cuando se empleó la IL-6, sola o en combinación con el PDB, excepto cuando las dosis de citocina utilizada fueron de 2.5 ng/ml, 312 pg/ml, 156 pg/ml y 0.625 pg/ml (Figura 19).

6. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS A UN ANTICUERPO ESPECÍFICO FRENTE A LA IL-6 EXÓGENA

Se realizaron los estudios de proliferación con una duración de tres y siete días. Se analizó la acción del anticuerpo específico frente a la IL-6, solo o en combinación con el éster de forbol, sobre la proliferación de los linfocitos B leucemicos. El Anti-IL6 se adicionó en dieciséis dosis comprendidas entre 25 µg/ml y 0.5 ng/ml.

6.1. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a tres días

La duración de los experimentos fue de tres días y la concentración celular fue de 100.000 células por pocillo de la placa de proliferación.

6.1.a. Empleo de un anticuerpo específico frente a la IL-6

En veinticinco muestras de linfocitos B purificados se realizó el estudio de la respuesta proliferativa cuando se había añadido al medio de cultivo un anticuerpo específico recombinante frente a la interleucina 6 (Anti-IL6). El análisis posterior se redujo a veintidós, tras excluir del estudio tres pacientes con purificación celular leucémica insuficiente (Figuras 20 y 22).

Ninguna de las dosis de Anti-IL6 empleada hizo proliferar a las células leucémicas. Los índices de proliferación no fueron superiores a 2.00 en ningún caso. No se observó una relación lineal dosis de Anti-IL6/respuesta. Tampoco se objetivó inhibición de la proliferación con el empleo de dicho mitógeno.

Las medias de los índices de proliferación de las diferentes dosis de Anti-IL6 empleadas oscilaron entre 0.62 ± 0.30 (rango: 0.24 - 1.30; para la dosis de Anti-IL6 de 45 ng/ml) y 1.01 ± 0.84 (rango: 0.18 - 4.27; para la dosis de Anti-IL6 de 1.5 $\mu\text{g/ml}$) ($p < 0.05$) (Tabla 20).

Asímismo, las medianas de los índices de proliferación estaban comprendidos entre 0.55 (para la dosis de Anti-IL6 de 20 ng/ml) y 0.99 (para la dosis de Anti-IL6 de 750 ng/ml).

Se observó diferencia ($p < 0.05$) en los índices de proliferación entre tres de las dosis utilizadas de Anti-IL6 (6 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 180 ng/ml) y las de IL-6 (5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 156 pg/ml). No se realizó la comparación estadística de todas las dosis de ambos mitógenos entre sí (Figura 22).

6.1.b. Empleo de un anticuerpo específico frente a la IL-6 asociado al éster del forbol

En las veintidós muestras de linfocitos B purificados del apartado anterior se realizó el estudio de la respuesta proliferativa cuando se emplearon, de forma conjunta, los mitógenos Anti-IL6 y PDB, a las dosis comentadas (Figuras 20 y 23).

En este experimento, con tres de las dosis de Anti-IL6 (12.5 $\mu\text{g/ml}$, 1.5 $\mu\text{g/ml}$, 750 ng/ml), empleadas en combinación con el éster del forbol, se obtuvo una respuesta de proliferación. Los índices de proliferación obtenidos con estas

tres dosis del anticuerpo específico frente a la IL-6 fueron de 2.04 ± 3.01 (rango: 0.31 - 13.92), 2.13 ± 3.51 (rango: 0.44 - 16.47), y 2.05 ± 3.29 (rango: 0.53 - 15.83), respectivamente. No se observó una relación lineal dosis de Anti-IL6/respuesta proliferativa. Tampoco se objetivó inhibición de la proliferación por el empleo de ambos mitógenos; las medias de los índices de proliferación fueron en todos los casos superiores a 1.28.

Las medias de los índices de proliferación de las diferentes dosis de Anti-IL6, empleadas en combinación con el PDB, oscilaron entre 1.28 ± 1.14 (rango: 0.37 - 4.51; para la dosis de Anti-IL6 de 0.5 ng/ml) y 2.13 ± 3.51 (rango: 0.44 - 16.47; para la dosis de Anti-IL6 de 1.5 $\mu\text{g/ml}$) ($p < 0.05$) (Tabla 20).

Asímismo, las medianas de los índices de proliferación estaban comprendidas entre 0.77 (para la dosis de Anti-IL6 de 25 y 3 $\mu\text{g/ml}$) y 1.35 (para la dosis de Anti-IL6 de 1 ng/ml).

Al analizar de forma comparativa las distintas dosis de Anti-IL6, utilizadas de forma aislada o en combinación con el PDB, se observó diferencia significativa en los índices de proliferación con las todas las dosis de Anti-IL6 adicionadas ($p < 0.05$) (Figura 20).

Se observó diferencia ($p < 0.05$) en los índices de proliferación entre siete de las dosis de Anti-IL6 utilizadas y las de IL-6, ambos mitógenos en combinación con el PDB (Figura 23). No se realizó la comparación estadística de todas las dosis de ambos mitógenos entre sí.

6.2. Estudio de la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B realizado a siete días

Se diseñaron los experimentos con una duración de los cultivos de siete días y una concentración de 500.000 células por pocillo de la placa de proliferación (Figuras 21, 24 y 25).

TABLA 20. ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS B EN CULTIVO CON ANTI-IL6 Y ANTI-IL6 + PDB

Dosis de Anti-IL6	3 días. Anti-IL6	3 días. Anti-IL6 + PDB	7 días. Anti-IL6	7 días. Anti-IL6 + PDB
25 µg/ml	0.78 ± 0.35* (0.35 - 1.98)	1.95 ± 3.21 (0.33 - 15.04)	2.19 ± 2.01 (0.91 - 8.06)	2.16 ± 1.66 (0.19 - 6.27)
12.5 µg/ml	0.92 ± 0.60 (0.21 - 3.15)	2.04 ± 3.01 (0.31 - 13.92)	2.09 ± 2.09 (0.73 - 9.30)	2.20 ± 2.03 (0.17 - 7.73)
6 µg/ml	0.99 ± 0.42 (0.36 - 2.24)	1.97 ± 2.96 (0.44 - 14.03)	2.13 ± 2.22 (0.62 - 9.61)	2.30 ± 1.90 (0.17 - 6.68)
3 µg/ml	0.80 ± 0.39 (0.28 - 2.00)	1.71 ± 2.88 (0.26 - 13.44)	2.09 ± 2.23 (0.89 - 9.93)	2.41 ± 1.91 (0.18 - 6.78)
1.5 µg/ml	1.01 ± 0.84 (0.18 - 4.27)	2.13 ± 3.51 (0.44 - 16.47)	2.21 ± 1.86 (0.89 - 8.44)	2.33 ± 1.84 (0.16 - 6.13)
750 ng/ml	0.96 ± 0.37 (0.39 - 1.57)	2.05 ± 3.29 (0.53 - 15.83)	2.12 ± 1.91 (0.70 - 8.20)	2.40 ± 2.10 (0.17 - 7.32)
375 ng/ml	0.77 ± 0.42 (0.32 - 1.90)	1.81 ± 2.85 (0.39 - 13.57)	1.29 ± 0.91 (0.20 - 4.19)	2.20 ± 1.92 (0.21 - 6.09)
180 ng/ml	0.88 ± 0.55 (0.31 - 2.62)	1.74 ± 2.65 (0.38 - 12.51)	1.17 ± 0.86 (0.21 - 4.04)	2.16 ± 1.82 (0.23 - 6.30)
90 ng/ml	0.68 ± 0.26 (0.27 - 1.28)	1.68 ± 2.23 (0.33 - 10.44)	1.20 ± 0.81 (0.26 - 3.78)	2.03 ± 1.92 (0.19 - 7.32)
45 ng/ml	0.62 ± 0.30 (0.24 - 1.30)	1.71 ± 2.39 (0.31 - 11.04)	1.05 ± 0.64 (0.16 - 3.09)	1.80 ± 1.78 (0.22 - 7.02)
20 ng/ml	0.72 ± 0.43 (0.25 - 1.77)	1.72 ± 2.47 (0.32 - 11.25)	0.83 ± 0.39 (0.29 - 1.93)	1.80 ± 1.57 (0.20 - 5.71)
10 ng/ml	0.81 ± 0.27 (0.31 - 1.42)	1.78 ± 2.07 (0.24 - 9.72)	1.06 ± 0.41 (0.18 - 1.91)	2.35 ± 2.19 (0.19 - 8.69)
5 ng/ml	0.73 ± 0.33 (0.27 - 1.47)	1.74 ± 2.15 (0.25 - 9.61)	1.02 ± 0.67 (0.15 - 3.32)	1.68 ± 1.40 (0.14 - 4.81)
2.5 ng/ml	0.88 ± 0.59 (0.37 - 3.04)	1.76 ± 2.22 (0.33 - 10.40)	0.89 ± 0.37 (0.18 - 1.93)	1.78 ± 1.24 (0.18 - 4.15)
1 ng/ml	0.80 ± 0.52 (0.32-2.48)	1.89 ± 2.00 (0.36 - 9.85)	0.88 ± 0.33 (0.31 - 1.85)	1.75 ± 1.21 (0.19 - 4.08)
0.5 ng/ml	0.73 ± 0.47 (0.31 - 2.35)	1.28 ± 1.14 (0.37 - 4.51)	0.81 ± 0.20 (0.39 - 1.12)	1.42 ± 1.04 (0.16 - 3.58)

* Media ± D.S. (Rango).

* p < 0.05

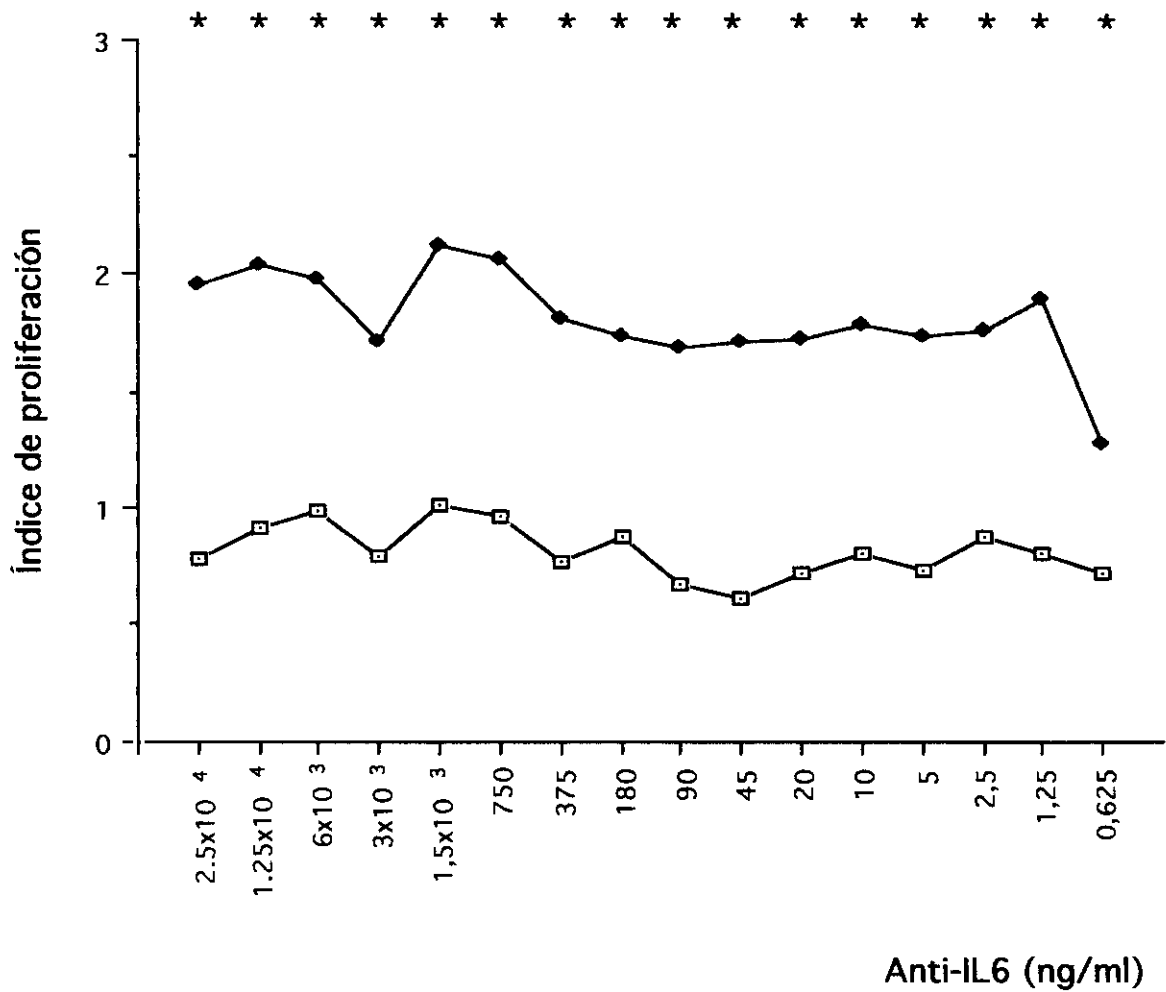


FIGURA 20. Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B con un anticuerpo específico frente a la IL-6 (Anti-IL6) y la combinación del Anti-IL6 y el PDB. Experimento realizado con una duración de tres días y una concentración celular de 100.000 células por pocillo.

—□— Anti-IL6 —◆— Anti-IL6 + PDB

* p < 0.05

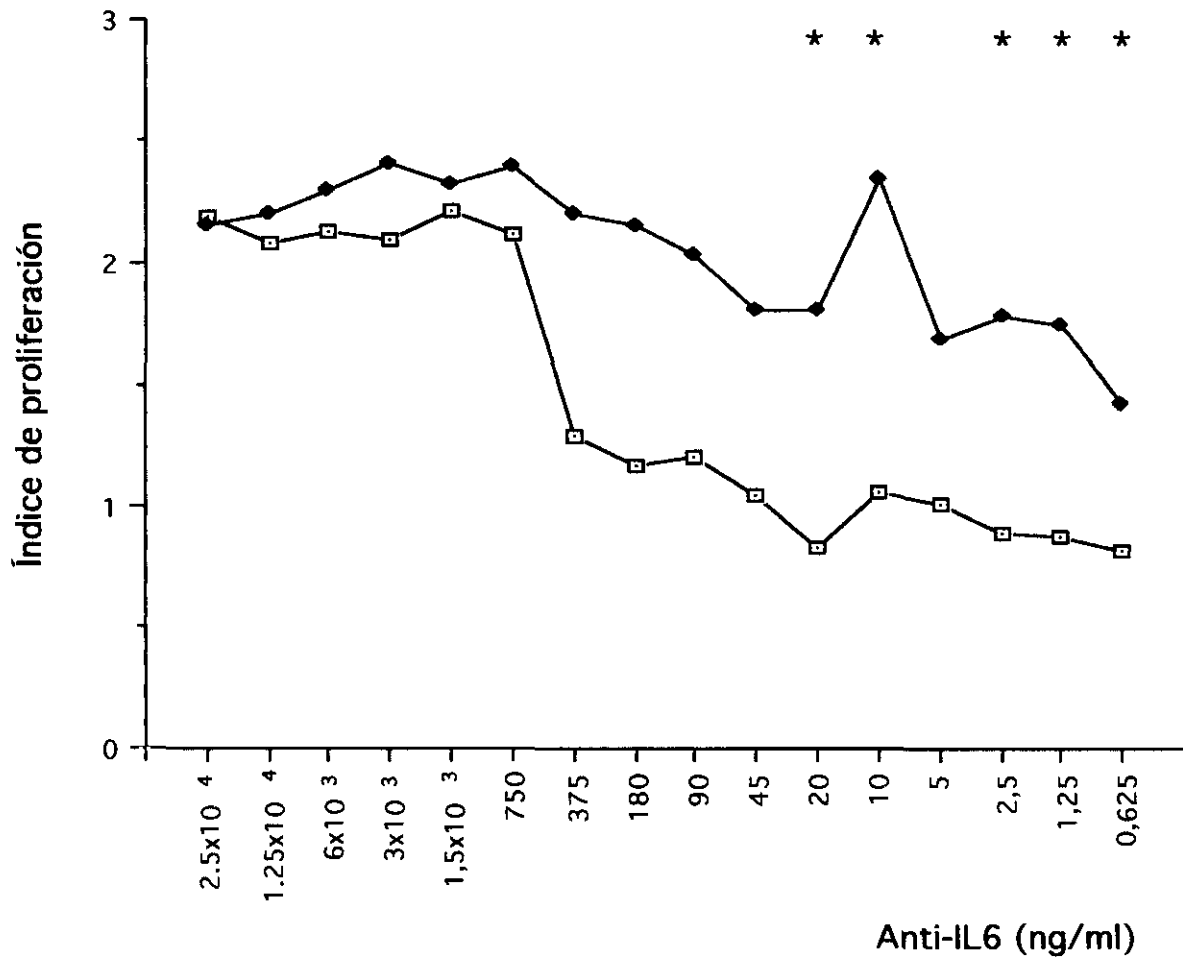


FIGURA 21. Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B con un anticuerpo frente a la IL-6 (Anti-IL6) y la combinación del Anti-IL6 y el PDB. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 500.000 células por pocillo.

—□— Anti-IL6

—◆— Anti-IL6 + PDB

6.2.a. Empleo de un anticuerpo específico frente a la IL-6 de forma aislada

En dieciséis muestras de linfocitos B purificados se realizó el estudio de la respuesta proliferativa cuando se había añadido al medio de cultivo un anticuerpo específico recombinante frente a la interleucina 6 (Anti-IL6), en las dosis ya mencionadas.

Las seis dosis superiores utilizadas del Anti-IL6 hicieron proliferar las células B leucémicas (25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 6 µg/ml, 3 µg/ml, 1.5 µg/ml, 750 ng/ml). Las medias de los índices de proliferación fueron, en estos casos, superiores a 2.00: 2.19 ± 2.01 (rango: 0.91 - 8.06), 2.09 ± 2.09 (rango: 0.73 - 9.30), 2.13 ± 2.22 (rango: 0.62 - 9.61), 2.09 ± 2.23 (rango: 0.89 - 9.93), 2.21 ± 1.86 (rango: 0.89 - 8.44), y 2.12 ± 1.91 (rango: 0.70 - 8.20), respectivamente. No se observó relación lineal dosis de Anti-IL6/respuesta proliferativa, aunque sí existió diferencia estadística (ANOVA con $p < 0.05$) entre las seis dosis superiores del anticuerpo frente a la IL-6 (25 µg/ml a 750 ng/ml) y el resto de las dosis adicionadas. Por último, no se objetivó inhibición de la proliferación por el empleo de dicho mitógeno.

Las medias de los índices de proliferación de las diferentes dosis de Anti-IL6 empleadas oscilaron entre 0.81 ± 0.20 (rango: 0.39-1.12; para la dosis de Anti-IL6 de 0.5 ng/ml) y 2.21 ± 1.86 (rango: 0.89-8.44; para la dosis de Anti-IL6 de 1.5 µg/ml) ($p < 0.05$) (Tabla 20).

Asímismo, las medianas de los índices de proliferación estaban comprendidos entre 0.79 (para la dosis de Anti-IL6 de 0.5 ng/ml) y 1.51 (para la dosis de Anti-IL6 de 1.5 µg/ml).

Se observó diferencia ($p < 0.05$) en los índices de proliferación entre las ocho dosis más altas de Anti-IL6 (25 µg/ml a 180 ng/ml) y de IL-6 (20 ng/ml a 156 pg/ml) empleadas (Figura 24). No se realizó la comparación estadística de todas las dosis de ambos mitógenos entre sí.

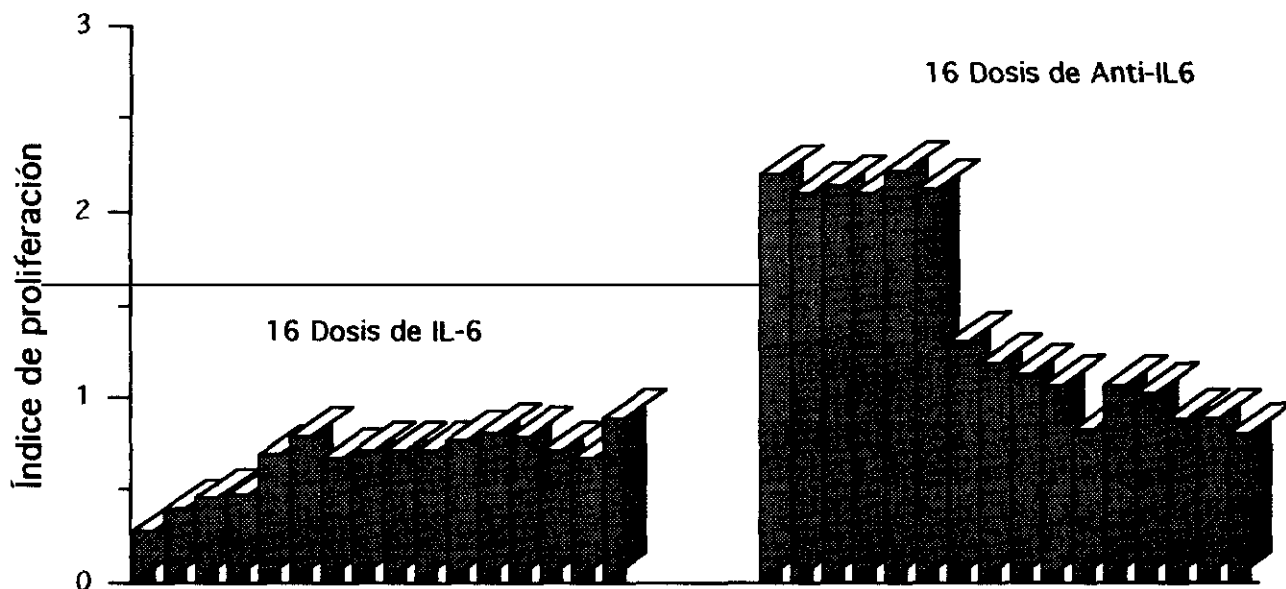
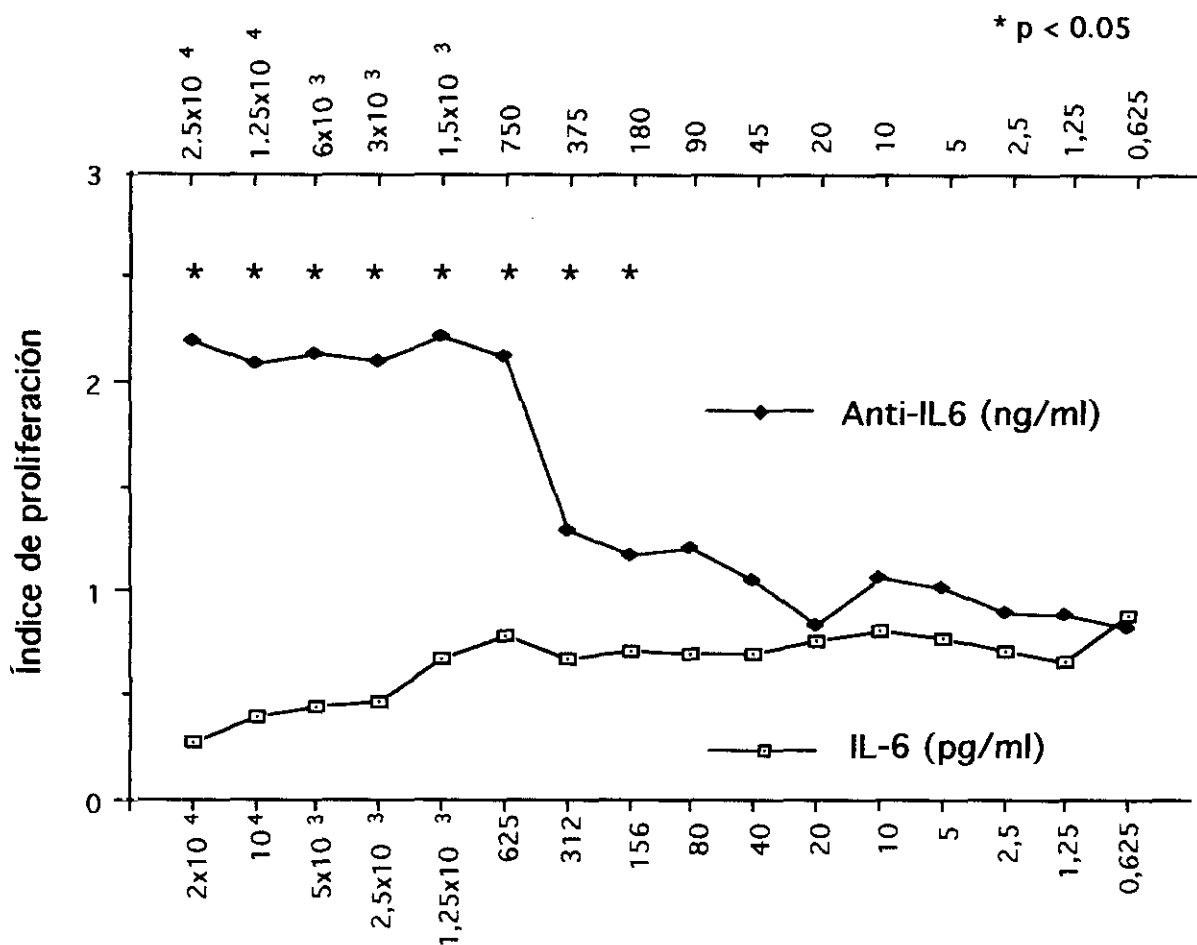


FIGURA 24. Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 y al anticuerpo frente a la IL-6 (Anti-IL6). Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 500.000 células por pocillo.

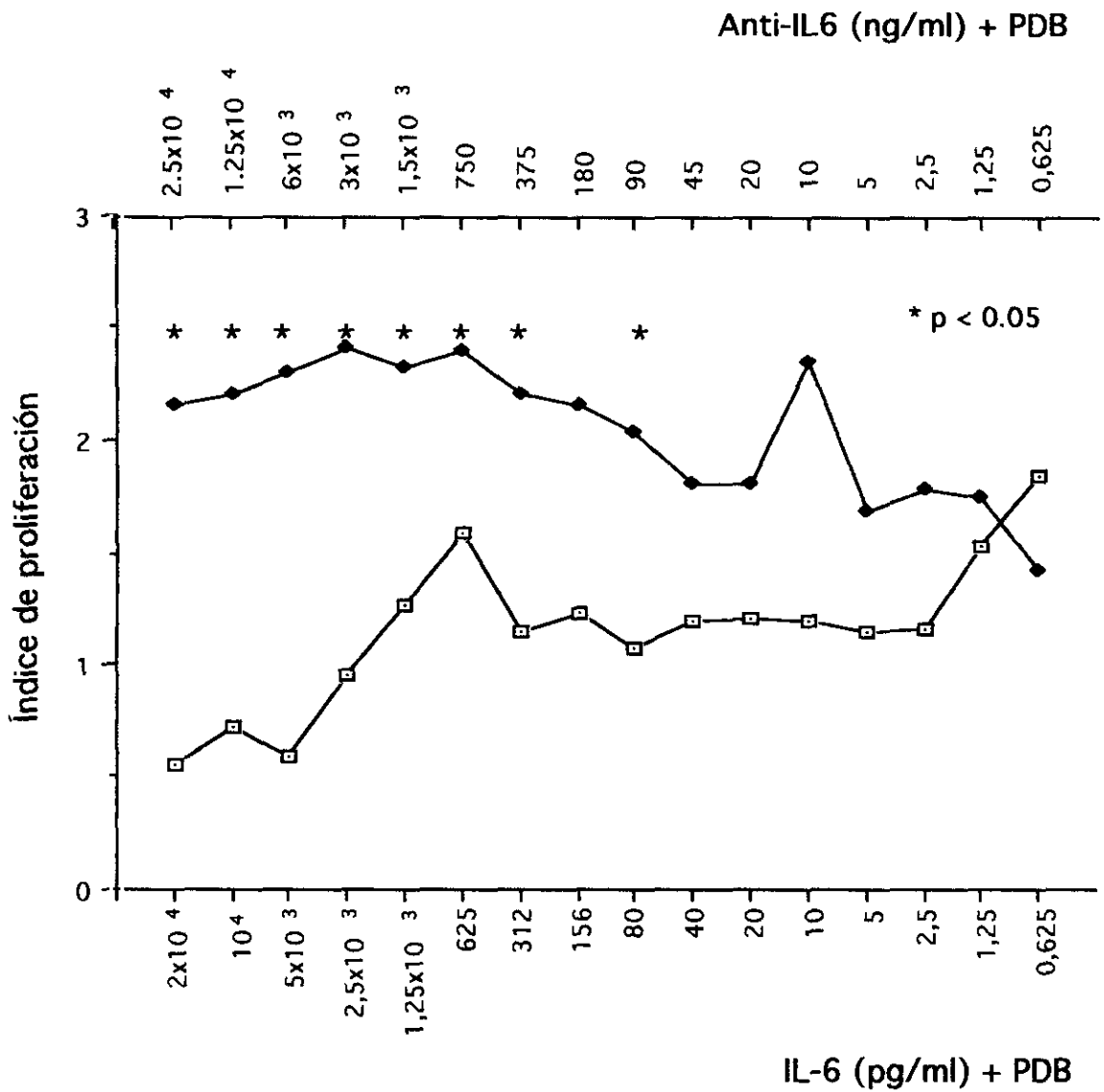


FIGURA 25. Determinación de la respuesta proliferativa (valores medios) de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6 + PDB y al anticuerpo frente a la IL-6 (Anti-IL6) + PDB. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración celular de 500.000 células por pocillo.

—□— IL-6 + PDB

—●— Anti-IL6 + PDB

6.2.b. Empleo de un anticuerpo específico frente a la IL-6 asociado al éster del forbol

En las mismas dieciséis muestras de linfocitos B purificados del apartado anterior se realizó el estudio de la respuesta proliferativa cuando se emplearon, de forma conjunta, los mitógenos Anti-IL6 y PDB. Las dosis de Anti-IL6 empleadas estuvieron comprendidas nuevamente entre 25 µg/ml y 0.5 ng/ml.

En esta ocasión, con las nueve dosis superiores de Anti-IL6 (comprendidas entre 25 µg/ml a 90 ng/ml), y con la de 10 ng/ml, empleadas en combinación con el éster del forbol, se obtuvo una respuesta de proliferación. Las medias de los índices de proliferación obtenidos con esas dosis del anticuerpo específico frente a la IL-6 fueron superiores a 2.00. No se observó una relación lineal dosis de Anti-IL6/respuesta proliferativa. Por último, no se objetivó inhibición de la proliferación por el empleo de ambos mitógenos.

Las medias de los índices de proliferación de las diferentes dosis de Anti-IL6, empleadas en combinación con el PDB, oscilaron entre 1.42 ± 1.04 (rango: 0.16 - 3.58; para la dosis de Anti-IL6 de 0.5 ng/ml) y 2.41 ± 1.91 (rango: 0.18 - 6.78; para la dosis de Anti-IL6 de 1.5 µg/ml) ($p < 0.05$) (Tabla 20).

Asimismo, las medianas de los índices de proliferación estaban comprendidos entre 0.92 (para la dosis de Anti-IL6 de 90 ng/ml) y 2.09 (para la dosis de Anti-IL6 de 25 µg/ml).

Se compararon las distintas dosis de Anti-IL6, solas y en asociación al PDB. Se observó que existía diferencia significativa en los índices de proliferación con las dosis de 20 ng/ml, 10 ng/ml, 2.5 ng/ml, 1 ng/ml y 0.5 ng/ml ($p < 0.05$) (Figura 21).

Se observó diferencia ($p < 0.05$) en los índices de proliferación entre las diez dosis más altas de Anti-IL6 (25 µg/ml a 45 ng/ml) y de IL-6 (20 ng/ml a 40 pg/ml) empleadas, ambos mitógenos en combinación con el PDB (Figura 25). No se realizó la comparación estadística de todas las dosis de ambos mitógenos entre sí.

En las Figuras 26 y 27 se representan los valores de siete muestras de LLC-B purificadas, mantenidas en cultivo durante siete días a una concentración de 500.000 células/pocillo, en presencia de IL-6 (dosis de 20, 10 y 1,25 ng/ml) o del Anti-IL6 (dosis de 25, 1,25 y 0.75 µg/ml), comparándolas con el valor basal.

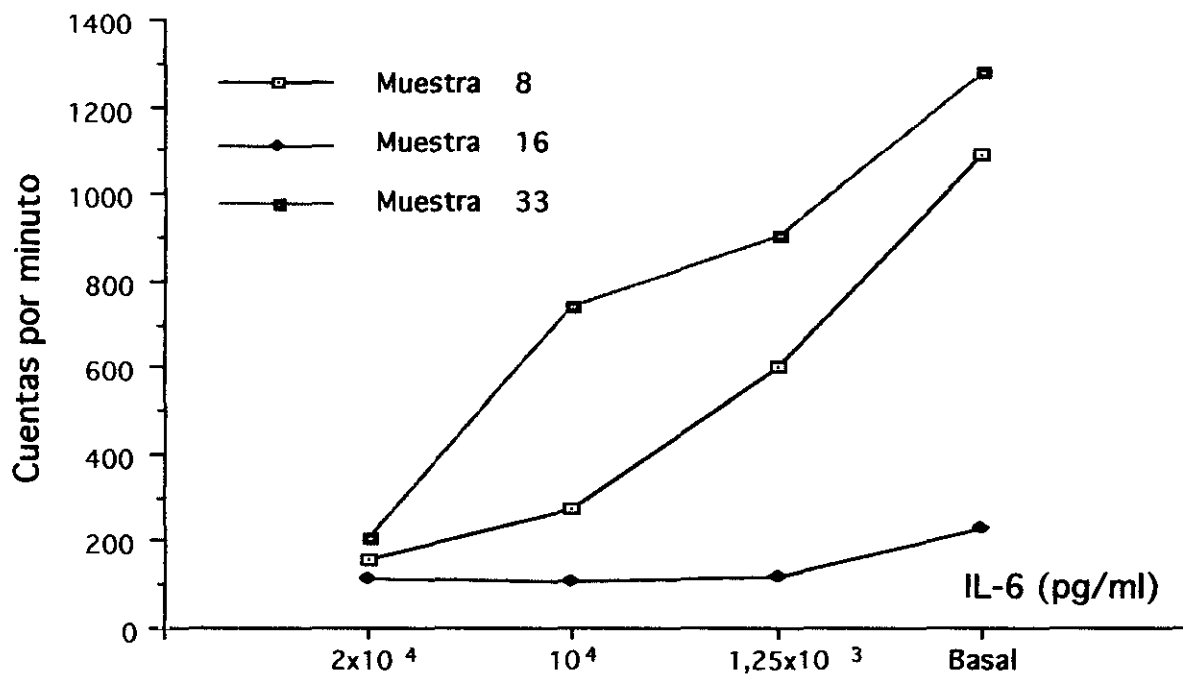
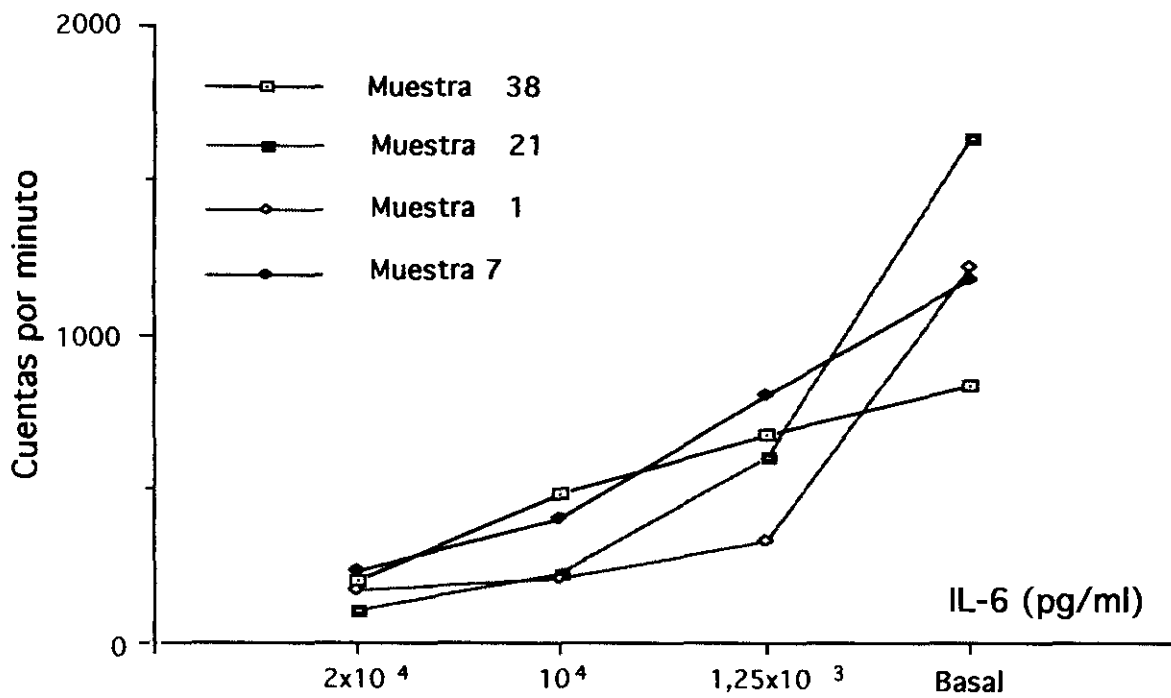


FIGURA 26. Determinación de la respuesta proliferativa de los linfocitos B de la LLC-B a la IL-6, en siete muestras. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración de 500.000 células por pocillo.

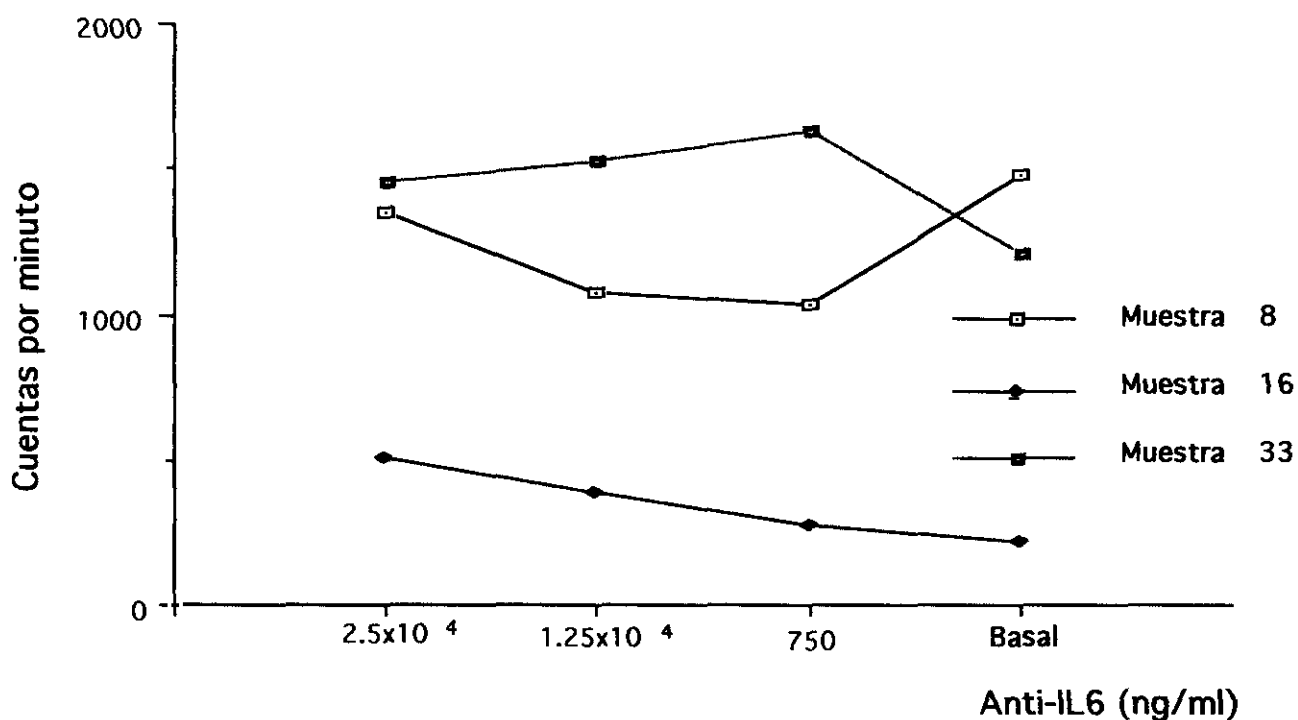
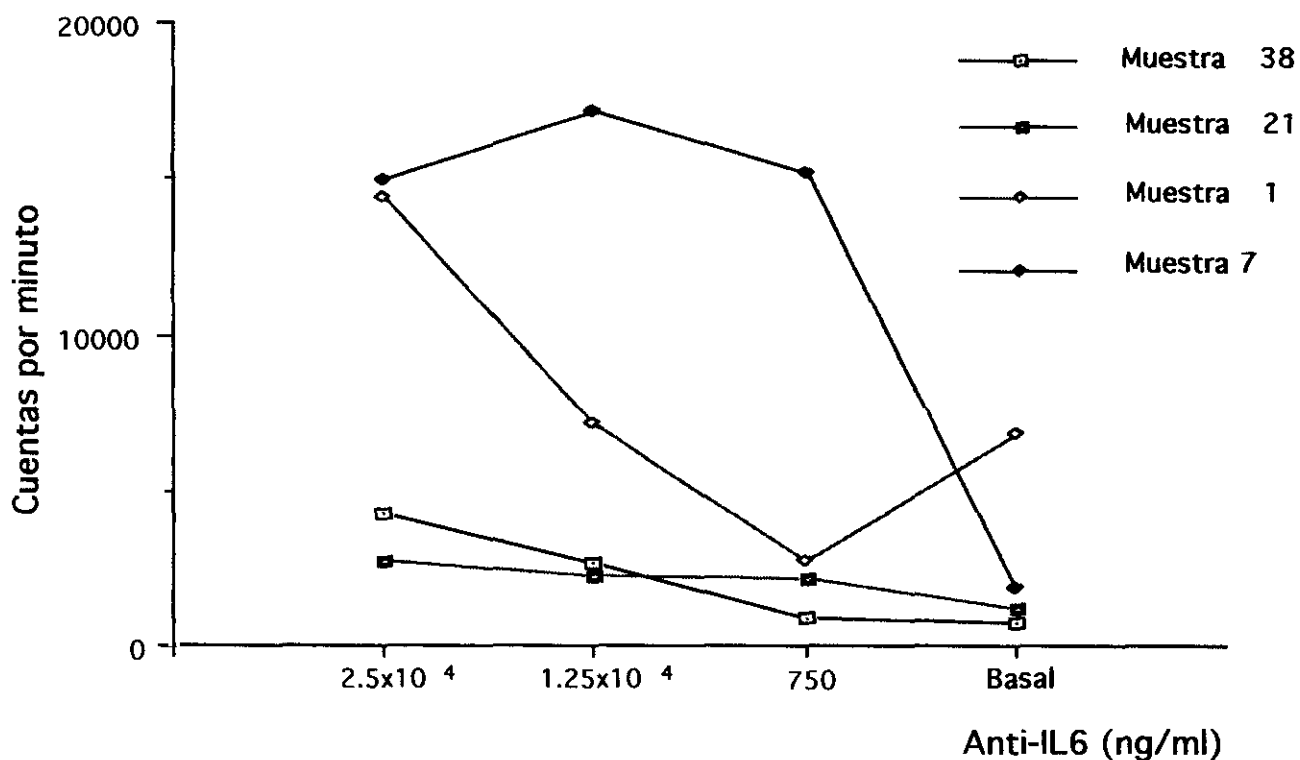


FIGURA 27. Determinación de la respuesta proliferativa de los linfocitos B de la LLC-B a un anticuerpo frente a la IL-6 (Anti-IL6), en siete muestras. Experimento realizado con una duración de siete días y una concentración de 500.000 células por pocillo.

7. CUANTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA IL-6 Y DE SU RECEPTOR SOLUBLE EN SUERO

Se analizó la presencia de interleucina 6 y del receptor soluble de la interleucina 6 en el suero de los treinta y nueve pacientes incluidos en esta serie. Con el método de ELISA empleado, la concentración mínima de IL-6 detectada es de 0.70 pg/ml, y de 140 pg/ml para el receptor soluble de la IL-6.

7.1. IL-6 en suero

En todas las muestras de suero analizadas la concentración de IL-6 fue inferior a 0.70 pg/ml (Tabla 21).

7.2. Receptor soluble de la IL-6 en suero

En todas las muestras de suero analizadas la concentración del receptor soluble de la IL-6 osciló entre 77 y 178 ng/ml (media \pm D.S.: 144.6 ± 20.3) (Tabla 22).

Distribuidos los pacientes según los grupos de riesgo de la clasificación de Rai, las veintidós muestras incluidas dentro del grupo de riesgo bajo (estadio 0) tenían una concentración sérica del receptor soluble de la IL-6 de 142.2 ± 23.5 (rango: 77.0 - 169.0); para las catorce muestras del grupo de riesgo medio (estadios I y II de la clasificación de Rai) fue de 147.0 ± 19.9 (rango: 124.5 - 178.0); para las tres muestras del grupo alto (estadios III y IV) fue de 151.8 ± 13.2 (rango: 137.0 - 162.5). Las diferencias no fueron estadísticamente significativas, como tampoco lo fueron cuando los enfermos se separaron siguiendo el sistema de estadiaje de Binet.

TABLA 21. CUANTIFICACIÓN DE LA IL-6 EN SUERO Y EN LOS SOBRENADANTES DE LAS CÉLULAS B EN CULTIVO

Pac.	suero pg/ml	sobrenadantes de las células B en cultivo (pg/ml)					
		24 horas Basal	24 horas PDB	72 horas Basal	72 horas PDB	5 días Basal	7 días Basal
1	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7
2	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7
3	<0.7	<0.7	-	<0.7	-	-	-
4	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7
5	<0.7	350	-	360	350	-	-
6	<0.7	<0.7	-	<0.7	-	-	-
7	<0.7	125	-	120	240	93	125
8	<0.7	355	-	355	360	360	360
9	<0.7	300	-	325	230	350	-
10	<0.7	270	-	250	140	-	-
11	<0.7	50	-	45	-	-	-
12	<0.7	261	-	231	-	-	-
13	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	34	<0.7	<0.7
14	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	2	<0.7	<0.7
15	<0.7	7.5	143	7.5	380	<0.7	<0.7
16	<0.7	22	-	20	46	28	<0.7
17	<0.7	156	-	-	-	404	172
18	<0.7	25	-	40	200	28	30
19	<0.7	<0.7	-	<0.7	11.5	<0.7	28
20	<0.7	60	425	320	625	60	60
21	<0.7	20	50	25	50	20	20
22	<0.7	20	25	20	40	20	20
23	<0.7	25	60	25	110	20	40
24	<0.7	54	-	98	-	56	68
25	<0.7	138	-	112	-	86	70
26	<0.7	<0.7	-	1.8	21	<0.7	<0.7
27	<0.7	344	-	354	22	244	272
28	<0.7	360	-	360	155	360	360
29	<0.7	-	-	360	380	-	-
30	<0.7	27	-	28	71	43	28
31	<0.7	300	-	305	33	206	172
32	<0.7	9	-	9	360	9	9
33	<0.7	20	-	20	380	19	21
34	<0.7	30	-	16	-	174	52
35	<0.7	28	28	46	21	28	31
36	<0.7	2	-	1.5	-	2	2
37	<0.7	-	-	-	-	-	-
38	<0.7	380	360	420	400	370	400
39	<0.7	390	395	380	390	380	381

n=39	<0.7	111.7±140.0 (0.7-390)*	114.6±157.8 (0.7-425)	126.0±150.4 (0.7-420)	174.3±172.0 (0.7-625)	108.6±141.6 (0.7-404)	90.9±127.5 (0.7-400)
------	------	---------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	-------------------------

* Media ± D.S. (rango)

TABLA 22. CUANTIFICACIÓN DEL RECEPTOR SOLUBLE DE LA IL-6 EN SUERO Y EN LOS SOBRENADANTES DE LAS CÉLULAS B EN CULTIVO

Pac.	suero (ng/ml)	sobrenadantes de las células B en cultivo (pg/ml)					
		24 horas Basal	24 horas PDB	72 horas Basal	72 horas PDB	5 días Basal	7 días Basal
1	130	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
2	157	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
3	137	<3.5	-	<3.5	-	-	-
4	156	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
5	156	<3.5	-	<3.5	-	-	-
6	126	<3.5	-	<3.5	-	-	-
7	165	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
8	166.5	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
9	124.5	<3.5	-	<3.5	-	-	-
10	135	<3.5	-	<3.5	-	-	-
11	150.5	<3.5	-	<3.5	-	-	-
12	134.5	<3.5	-	<3.5	-	-	-
13	134	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
14	169	-	-	-	-	<3.5	<3.5
15	110.5	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
16	156	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
17	136.5	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
18	150.5	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
19	166.5	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
20	136	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
21	150	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
22	77	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
23	166.5	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
24	160	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
25	158	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
26	131	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
27	165.5	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
28	162.5	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
29	149.5	<3.5	-	<3.5	-	-	-
30	151.5	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
31	178	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
32	126	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
33	124.5	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
34	128	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
35	169	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
36	169	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
37	126	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
38	128	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5
39	124.5	<3.5	-	<3.5	-	<3.5	<3.5

n=39 | $\frac{144.6 \pm 20.3}{(77-178)*}$ | <3.5 ± 0 - <3.5 ± 0 - <3.5 ± 0 <3.5 ± 0

* Media ± D.S. (rango). Los niveles en personas sanas oscilan entre 13.5 y 45.9

8. CUANTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA IL-6 Y DE SU RECEPTOR SOLUBLE EN LOS SOBRENADANTES DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS EN CULTIVO

Se analizó la presencia de interleucina 6 y del receptor soluble de la interleucina 6 en los sobrenadantes de los treinta y nueve pacientes incluidos en esta serie. Los sobrenadantes se obtuvieron tras mantener las células leucémicas purificadas en cultivo durante uno, tres, cinco y siete días. El cultivo se realizó sin el empleo de mitógenos salvo cuando se llevó a cabo con una duración de uno y tres días, en cuyo caso se empleó también el éster del forbol (PDB).

8.1. Detección de la IL-6 en los sobrenadantes

La concentración de IL-6 en los sobrenadantes tras 24 horas de cultivo osciló entre 0.7 y 390 pg/ml (media \pm D.S.: 111.7 ± 140.0); tras 24 horas en presencia de PDB, la concentración fue de 114.6 ± 157.8 (rango: 0.7 - 425 pg/ml); tras 72 horas en cultivo, de 126.0 ± 150.4 (rango: 0.7 - 420); después de 72 horas con el éster del forbol de 174.3 ± 172.0 (rango: 0.7 - 625 pg/ml); tras cinco días de 108.6 ± 141.6 (rango: 0.7 - 404 pg/ml); por último, tras siete días en cultivo, sin contacto con mitógenos, la concentración de IL-6 en los sobrenadantes fue de 90.9 ± 127.5 (rango: 0.7 - 400 pg/ml) (Tabla 21). Estas diferencias sólo fueron importantes ($p < 0.05$) entre la cantidad de citocina detectada tras 24 horas en contacto con PDB y tras 72 horas en presencia de ese mismo mitógeno.

Cuando se distribuyeron los pacientes según los grupos de riesgo definidos por la clasificación de Rai, se observó que la concentración de IL-6, detectada en los sobrenadantes de células B en cultivo sin contacto con el PDB, era mayor en las muestras de los enfermos incluidos en el grupo de riesgo medio (estadios I y II) que en el bajo (estadio 0). Sólo tres pacientes pertenecían al grupo de riesgo alto (estadios III y IV), por lo que no resultó valorable la comparación estadística en él. Así, los valores tras 24 horas de cultivo en situación basal fueron de 96.7 ± 135.3 (rango: 0.7 - 355.0) para las muestras de los pacientes en el grupo de riesgo bajo, y de 127.1 ± 151.0 (rango: 0.7 - 380.0) para el grupo de riesgo medio; tras 72 horas de cultivo sin contacto con mitógenos, los resultados fueron de 129.3 ± 151.0 (rango: 0.7 - 360.0) y de 130.8 ± 168.0 (rango: 0.7 - 420.0); después de cinco

días, en las mismas condiciones de cultivo, fueron de 52.8 ± 103.5 (rango: 0.7 - 360) y de 132.2 ± 160.0 (rango: 0.7 - 404); tras siete días, fueron de 53.7 ± 103.2 (rango: 0.7 - 360.0) y de 99.6 ± 131.8 (rango: 0.7 - 400.0). Por el contrario, se detectó mayor cantidad de IL-6 en los sobrenadantes de las células leucémicas cultivadas durante tres días en contacto con el éster del forbol, en los pacientes incluidos en el grupo de riesgo bajo (197.4 ± 189.9 ; rango: 2 - 625) que en las muestras de los enfermos del grupo de riesgo medio (125.9 ± 156.5 ; rango: 0.7 - 400). A pesar de ello, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, excepto en el caso de la cantidad de IL-6 detectada en los sobrenadantes de los linfocitos B leucémicos tras 24 horas en cultivo en situación basal ($p = 0.076$). Los mismos resultados se obtuvieron al distribuir las muestras leucémicas según la clasificación de Binet.

8.2. Detección del receptor soluble de la IL-6 en los sobrenadantes

Se analizaron los sobrenadantes tras obtenerlos de los cultivos de las células B, como se detalla en el apartado 3.3.a del capítulo de Métodos. En todas las muestras estudiadas se detectó la presencia del receptor soluble de la IL-6 en una concentración inferior a 3.5 pg/ml, tanto en el día uno, tres, cinco o siete de cultivo (Tabla 22).

9. ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS B LEUCÉMICAS CON IL-6, IL-2 Y PDB

Se analizó la acción de la IL-6 sobre la diferenciación de las células B purificadas. Para ello se determinó la cuantificación de las inmunoglobulinas secretadas por las células leucémicas en presencia y ausencia de dicha citocina. Además, se llevó a cabo un análisis fenotípico de la población celular en contacto con la IL-6 exógena al término de los siete días de cultivo celular programado.

9.1. Cuantificación de inmunoglobulinas

Se realizó en veinte muestras de células B leucémicas purificadas, que se mantuvieron en cultivo durante siete días. El porcentaje de linfocitos T y de monocitos de dichas poblaciones fue inferior al 5%. Los mitógenos empleados fueron la interleucina 6 -sola o combinada con el PDB-, la interleucina 2 y el PDB. El rango de dosis de IL-6 utilizada fue de 20 ng/ml a 0.625 pg/ml (dieciséis dosis). Junto a ello se cultivaron células sin mitógeno alguno con el fin de comparar los resultados. Al completar la semana de cultivo se cuantificó, en los sobrenadantes de los cultivos, la producción de inmunoglobulinas de la clase G (IgG), M (IgM) y A (IgA) por parte de los linfocitos de las LLC-B, mediante técnicas de ELISA. Con este método, la concentración mínima de inmunoglobulina detectada fue de 2 ng/ml y la máxima de 250 ng/ml.

Cuantificación de la IgG

Se analizaron diecinueve muestras de linfocitos B purificados. En condiciones basales -sin la adición de mitógeno alguno- la producción de IgG, detectada en los sobrenadantes de los cultivos, fue de 7.4 ± 16.4 ng/ml (rango: 2 - 67 ng/ml) (Tabla 23).

Con el empleo de la IL-6 exógena (dosis usadas entre 20 ng/ml y 0.625 pg/ml), la producción de dicha inmunoglobulina estuvo comprendida entre 4.1 ± 5.4 ng/ml (rango: 2 - 18 ng/ml; para la dosis de 20 ng/ml de IL-6) y 7.3 ± 13.9 ng/ml (rango: 2 - 56 ng/ml; para la dosis de 2.5 ng/ml de IL-6) (Tabla 24).

La media de los valores de detección de la IgG en los sobrenadantes cuando se usó el PDB fue de 6.7 ± 14.7 (rango: 2 - 60 ng/ml); de 6.7 ± 13.6 con la utilización de la PHA (rango: 2 - 55 ng/ml), y de 7.0 ± 14.8 (rango: 2 - 61 ng/ml) con la IL-2, empleada a la dosis de 100 U/ml (Tabla 23).

Con la combinación de la IL-6 -en las dosis ya mencionadas- con el éster del forbol, se obtuvo una producción de IgG comprendida entre 4.9 ± 9.9 ng/ml (rango: 2 - 42 ng/ml; para la dosis de 20 ng/ml de IL-6) y 7.0 ± 15.3 ng/ml (rango: 2 - 65 ng/ml; para la dosis de 5 pg/ml de IL-6) (Tabla 25).

En conclusión, no se apreció que la IL-6, sola o en combinación con el éster del forbol, indujera la producción de IgG por las células B leucémicas (n.s.). Tampoco se evidenció (n.s.) que el PDB, la PHA o la IL-2, todos de forma aislada, indujeran la diferenciación del linfocito leucémico.

Cuantificación de la IgA

Se analizaron veinte muestras. En condiciones basales la producción de IgA, detectada en los sobrenadantes de los cultivos, fue de 6.7 ± 15.5 ng/ml (rango: 2 - 65 ng/ml) (Tabla 23).

Con el empleo de la IL-6 exógena (dosis usadas entre 20 ng/ml y 0.625 pg/ml), la producción de IgA estuvo comprendida entre 2.6 ± 1.7 ng/ml (rango: 2 - 8 ng/ml; para la dosis de 20 ng/ml de IL-6) y 6.4 ± 12.7 ng/ml (rango: 2 - 51 ng/ml; para la dosis de 2.5 ng/ml de IL-6) (Tabla 24).

La media de los valores de detección de la IgA en los sobrenadantes cuando se usó el PDB fue de 3.3 ± 4.4 (rango: 2 - 20 ng/ml); de 6.8 ± 15.2 con la utilización de la PHA (rango: 2 - 63 ng/ml), y con la IL-2, empleada a la dosis de 100 U/ml, de 6.0 ± 14.1 (rango: 2 - 60 ng/ml) (Tabla 23).

Con la combinación de la IL-6 -en las dosis ya mencionadas- con el éster del forbol, se obtuvo una producción de IgA comprendida entre 2.1 ± 0.6 ng/ml (rango: 2 - 4.3 ng/ml; para la dosis de 20 ng/ml de IL-6) y 3.3 ± 5.0 ng/ml (rango: 2 - 25 ng/ml; para la dosis de 40 pg/ml de IL-6) (Tabla 25).

En conclusión, no se apreció que la IL-6, sola o en combinación con el éster del forbol, indujera la producción de inmunoglobulina de la clase A por las células B leucémicas (no hubo diferencia estadísticamente significativa en comparación con la cifra basal). Tampoco se evidenció que el PDB, la PHA o la IL-2, todos de forma aislada, indujeran la diferenciación del linfocito leucémico (n.s.).

Cuantificación de la IgM

Se analizaron diecinueve muestras. En condiciones basales la producción de IgM, detectada en los sobrenadantes de los cultivos, fue de 12.5 ± 21.9 ng/ml (rango: 2 - 70 ng/ml) (Tabla 23).

Con el empleo de la IL-6 exógena (dosis usadas entre 20 ng/ml y 0.625 pg/ml), la producción de IgM osciló entre 8.9 ± 13.1 ng/ml (rango: 2 - 46 ng/ml; para la dosis de 20 ng/ml de IL-6) y 17.2 ± 44.4 ng/ml (rango: 2 - 195 ng/ml; para la dosis de 20 pg/ml de IL-6) (Tabla 24).

La media de los valores de detección de la IgM en los sobrenadantes cuando se usó el PDB fue de 63.5 ± 101.8 (rango: 2 - 250 ng/ml), de 14.3 ± 25.3 con la utilización de la PHA (rango: 2 - 90 ng/ml), y con la IL-2, empleada a la dosis de 100 U/ml, de 17.9 ± 24.5 (rango: 2 - 75 ng/ml) (Tabla 23).

Con la combinación de la IL-6 -en las dosis ya mencionadas- con el éster del forbol, se obtuvo una producción de IgM comprendida entre 47.1 ± 74.9 ng/ml (rango: 2 - 250 ng/ml; para la dosis de 20 ng/ml de IL-6) y 72.0 ± 100.1 ng/ml (rango: 2 - 250 ng/ml; para la dosis de 5 ng/ml de IL-6) (Tabla 25).

En conclusión, se objetivó la producción de IgM por las células leucémicas en contacto con el éster del forbol, bien de forma aislada o en combinación con las diferentes dosis de la IL-6 ($p < 0.05$). Sin embargo, la presencia en el cultivo de la IL-6 aislada sólo indujo una leve producción de IgM (n.s.). La IL-2, a la dosis empleada, indujo la producción de IgM ($p < 0.05$). La PHA no estimuló la síntesis de esta inmunoglobulina (n.s.).

9.2. Estudio fenotípico

En cuatro muestras de células leucémicas purificadas, incluidas en las analizadas en el apartado anterior, se realizó un estudio fenotípico tras un cultivo de las células leucémicas, con adición de IL-6, de siete días de duración para ver si continuaban expresando o no, en su membrana de superficie, la cadena ligera kappa o lambda de las inmunoglobulinas. De igual forma se

TABLA 23. PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS POR LAS CÉLULAS B LEUCÉMICAS: BASAL, CON PDB, PHA E IL-2

Mitógeno	IgG (ng/ml)	IgA (ng/ml)	IgM (ng/ml)
Basal	7.4 ± 16.4 (2 - 67)*	6.7 ± 15.5 (2 - 65)	12.5 ± 21.9 (2 - 70)
PDB	6.7 ± 14.7 (2 - 60)	3.3 ± 4.4 (2 - 20)	63.5 ± 101.8 (2-250)
PHA	6.7 ± 13.6 (2 - 55)	6.8 ± 15.2 (2 - 63)	14.3 ± 25.3 (2 - 90)
IL-2 (100 U/ml)	7.0 ± 14.8 (2 - 61)	6.0 ± 14.1 (2 - 60)	17.9 ± 24.5 (2 - 75)

* Media ± D.S. (Rango).

TABLA 24. PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS POR LAS CÉLULAS B LEUCÉMICAS: CON IL-6

Dosis de IL-6	IgG (ng/ml)	IgA (ng/ml)	IgM (ng/ml)
20 ng/ml	4.1 ± 5.4 (2 - 18)*	2.6 ± 1.7 (2 - 8)	8.9 ± 13.1 (2 - 46)
10 ng/ml	6.4 ± 12.4 (2 - 50)	4.3 ± 7.0 (2 - 30)	14.0 ± 24.4 (2 - 82)
5 ng/ml	6.4 ± 12.7 (2 - 51)	5.6 ± 11.3 (2 - 46)	17.2 ± 29.3 (2 - 92)
2.5 ng/ml	7.3 ± 13.9 (2 - 56)	6.4 ± 12.7 (2 - 51)	14.4 ± 24.1 (2 - 85)
1.25 ng/ml	6.3 ± 13.6 (2 - 62)	5.9 ± 12.7 (2 - 60)	10.5 ± 22.5 (2 - 98)
625 pg/ml	6.8 ± 14.0 (2 - 60)	5.5 ± 11.6 (2 - 54)	11.7 ± 25.4 (2 - 110)
312 pg/ml	6.5 ± 13.0 (2 - 55)	6.1 ± 13.9 (2 - 65)	11.6 ± 22.8 (2 - 90)
156 pg/ml	6.3 ± 11.9 (2 - 51)	5.8 ± 13.5 (2 - 64)	11.6 ± 22.5 (2 - 90)
80 pg/ml	6.7 ± 12.6 (2 - 56)	6.0 ± 14.4 (2 - 67)	12.3 ± 22.8 (2 - 90)
40 pg/ml	6.2 ± 12.8 (2 - 58)	6.0 ± 13.9 (2 - 65)	11.6 ± 23.5 (2 - 98)
20 pg/ml	6.7 ± 15.0 (2 - 77)	6.2 ± 14.4 (2 - 67)	17.2 ± 44.4 (2 - 195)
10 pg/ml	7.0 ± 16.2 (2 - 73)	5.0 ± 10.7 (2 - 51)	9.5 ± 15.0 (2 - 54)
5 pg/ml	7.0 ± 14.8 (2 - 66)	4.6 ± 8.9 (2 - 43)	12.5 ± 24.1 (2 - 98)
2.5 pg/ml	6.5 ± 14.3 (2 - 65)	6.2 ± 15.9 (2 - 75)	14.2 ± 31.4 (2 - 135)
1.25 pg/ml	6.1 ± 13.2 (2 - 60)	6.1 ± 15.2 (2 - 67)	13.9 ± 30.3 (2 - 130)
0.625 pg/ml	6.3 ± 13.6 (2 - 61)	5.6 ± 13.7 (2 - 65)	10.8 ± 18.6 (2 - 72)

* Media ± D.S. (Rango).

TABLA 25. PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS POR LAS CÉLULAS B LEUCÉMICAS: CON IL-6 + PDB

Dosis de IL-6 + PDB	IgG (ng/ml)	IgA (ng/ml)	IgM (ng/ml)
20 ng/ml	4.9 ± 9.9 (2 - 42)*	2.1 ± 0.6 (2 - 4.3)	47.1 ± 74.9 (2 -250)
10 ng/ml	6.4 ± 14.4 (2 - 60)	2.9 ± 3.2 (2 - 15)	58.4 ± 92.2 (2 -250)
5 ng/ml	6.1 ± 12.3 (2 - 50)	3.0 ± 3.6 (2 - 16)	72.0 ± 100 (2 - 250)
2.5 ng/ml	6.1 ± 10.2 (2 - 41)	3.0 ± 3.1 (2 - 14)	65.4 ± 97.9 (2 -250)
1.25 ng/ml	5.5 ± 11.4 (2 - 52)	2.6 ± 2.2 (2 - 12)	59.9 ± 94.0 (2 -250)
625 pg/ml	6.8 ± 15.6 (2 - 70)	2.7 ± 2.2 (2 - 12)	59.3 ± 95.1 (2 -250)
312 pg/ml	6.8 ± 15.6 (2 - 70)	2.8 ± 3.3 (2 - 17)	54.9 ± 87.7 (2 -250)
156 pg/ml	6.8 ± 15.6 (2 - 70)	2.7 ± 3.0 (2 - 16)	57.2 ± 91.2 (2 -250)
80 pg/ml	5.6 ± 11.5 (2 - 52)	2.7 ± 3.0 (2 - 16)	57.2 ± 91.3 (2 -250)
40 pg/ml	6.5 ± 13.8 (2 - 60)	3.3 ± 5.0 (2 - 25)	50.2 ± 81.8 (2 -250)
20 pg/ml	6.2 ± 13.4 (2 - 60)	2.8 ± 3.5 (2 - 18)	52.2 ± 83.9 (2 -250)
10 pg/ml	6.9 ± 14.9 (2 - 65)	2.8 ± 3.0 (2 - 16)	52.9 ± 79.7 (2 -250)
5 pg/ml	7.0 ± 15.3 (2 - 65)	2.8 ± 2.9 (2 - 15)	57.1 ± 88.5 (2 -250)
2.5 pg/ml	6.4 ± 13.6 (2 - 60)	2.9 ± 3.9 (2 - 20)	60.3 ± 93.4 (2 -250)
1.25 pg/ml	5.9 ± 11.6 (2 - 50)	3.0 ± 4.3 (2 - 22)	54.5 ± 83.0 (2 -250)
0.625 pg/ml	6.5 ± 13.5 (2 - 60)	2.9 ± 3.9 (2 - 20)	55.1 ± 84.5 (2 -250)

* Media ± D.S. (Rango).

estudió los antígenos de superficie "Pan B", que habitualmente pierde el linfocito B normal al final de su proceso de maduración, es decir, al transformarse en célula plasmática. En esos cuatro pacientes se estudió también la diferente intensidad de expresión de los antígenos de superficie de membrana tras los siete días de cultivo. El cultivo se realizó en situación basal, y en contacto con IL-6 (a las dosis de 20 y 1 ng/ml) -aislada o en combinación con el éster del forbol-, la IL-2 (a la dosis de 100 U/ml) -aislada o en asociación al PDB-, el PDB y el SAC₂.

En ninguno de los cuatro pacientes analizados se objetivó la desaparición de la expresión de los antígenos de superficie "Pan B", ni que dejaran de presentar la cadena ligera λ o κ de las inmunoglobulinas. Además no se observó una disminución de la intensidad de fluorescencia de esos antígenos de superficie en comparación con las células analizadas en el día cero, y tras siete días de cultivo en situación basal.

10. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE LA IL-6 EN LA MEMBRANA DE SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS EN CULTIVO

Se realizó el análisis de la expresión del receptor de la IL-6 en la membrana de las células leucémicas que se habían mantenido en cultivo, bien en situación basal o en contacto con SAC₂, PDB, IL-6 o IL-2.

10.1. Cultivo en situación basal

En veintidós pacientes se estudió la expresión del receptor de la interleucina 6 en la membrana de los linfocitos B leucémicos, en situación basal y tras 1, 3, 5 y 7 días de cultivo, mediante citometría de flujo y utilizando triple marcaje (CD19 FITC, la IL-6 conjugada con PE, CD5 TC). El análisis se realizó sobre la población de células leucémicas CD19 (+), CD5 (+). El estudio se llevó a cabo mediante dos programas proporcionados por el citómetro de flujo: "Lysys II" y "Paint a gate".

Empleo del programa "Lysys II"

En todos los casos se objetivó la presencia del receptor de la IL-6 en un 40% a 100% de las células tumorales. Estos resultados proceden de realizar el cálculo matemático de la sustracción de histogramas que efectúa el programa "Lysys II" del citómetro de flujo. Al igual que ocurría cuando se estudió la muestra nada más realizar la selección negativa con AET, se trataba de una población celular uniforme sin una buena discriminación frente al valor elegido como negativo, por su baja densidad antigénica en la superficie de la membrana de los linfocitos (Tabla 26a).

Tras 24 horas de cultivo sin contacto con mitógenos, el $87.1\% \pm 8.7$ (rango: 60% - 100%) de los linfocitos B de las muestras de LLC-B expresaban el receptor de membrana de la IL-6. Tras 72 horas de cultivo y en las mismas condiciones, el $85.7\% \pm 8.6$ (rango: 65% - 100%) de esas células eran positivas para dicho antígeno de membrana. El día cinco de cultivo, el $81.8\% \pm 15.0$ (rango: 40% - 95%) de los linfocitos tumorales expresaban el receptor de la IL-6 en su membrana, frente al $84.0\% \pm 14.7$ (rango: 55% - 100%) de las células tras siete días de cultivo.

Empleo del programa "Paint a gate"

El porcentaje de células leucémicas con expresión del receptor de la interleucina 6 en la superficie de membrana osciló entre el 67% y el 100%, cuando el análisis se realizó con el programa "Paint a gate" del citómetro de flujo (Tabla 26b).

Tras 24 horas de cultivo sin contacto con mitógenos, el $90.6\% \pm 8.3$ (rango: 69% - 100%) de los linfocitos B de las muestras de LLC-B expresaban el receptor de membrana de la IL-6. Tras 72 horas de cultivo y en las mismas condiciones, el $92.8\% \pm 4.9$ (rango: 80% - 99%) de esas células eran positivas para dicho antígeno de membrana. El día cinco de cultivo, el $89.6\% \pm 8.2$ (rango: 74% - 99%) de los linfocitos tumorales expresaban el receptor de la IL-6 en su membrana, frente al $95.6\% \pm 2.9$ (rango: 90% - 100%) de las células tras siete días de cultivo.

TABLA 26a. EXPRESIÓN DEL R-IL6 EN LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS EN SITUACIÓN BASAL. PROGRAMA "LYSYS II"

Paciente	24 horas	72 horas	5 días	7 días
1	30% (85%)*	45% (82%)	30% (55%)	45% (75%)
4	55% (85%)	65% (90%)	40% (70%)	-
5	55% (90%)	60% (90%)	-	65% (95%)
7	60% (90%)	60% (90%)	-	75% (95%)
8	65% (90%)	60% (90%)	-	90% (100%)
9	70% (90%)	60% (85%)	45% (72%)	70% (90%)
10	62% (90%)	40% (70%)	55% (80%)	85% (95%)
13	50% (90%)	37% (93%)	-	55% (90%)
14	45% (85%)	30% (65%)	55% (90%)	35% (55%)
15	70% (90%)	50% (85%)	-	-
16	75% (95%)	85% (100%)	80% (95%)	80% (95%)
18	55% (93%)	55% (90%)	50% (85%)	60% (90%)
20	45% (95%)	65% (95%)	45% (90%)	60% (90%)
21	65% (93%)	60% (90%)	70% (95%)	50% (90%)
22	40% (80%)	40% (70%)	-	70% (85%)
26	35% (70%)	45% (80%)	10% (40%)	80% (86%)
27	60% (95%)	63% (95%)	60% (95%)	75% (95%)
32	30% (80%)	45% (85%)	50% (87%)	50% (75%)
33	40% (60%)	55% (80%)	45% (85%)	30% (50%)
34	55% (80%)	50% (90%)	60% (90%)	30% (55%)
35	85% (100%)	45% (80%)	60% (90%)	-
38	45% (90%)	55% (90%)	60% (90%)	70% (90%)
n=22	54.2% ± 14.2** (87.1% ± 8.7)*	53.2% ± 11.8 (85.7% ± 8.6)	53.9% ± 15.6 (81.8% ± 15.0)	61.8% ± 17.6 (84.0% ± 14.7)
	30% - 85% • (60% - 100%) •*	30% - 85% (65% - 100%)	10% - 80% (40% - 95%)	30% - 90% (55% - 100%)

* Los valores entre paréntesis están calculados realizando la sustracción de histogramas

** Media ± D.S. • Rango.

TABLA 26b. EXPRESIÓN DEL R-IL6 EN LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS EN SITUACIÓN BASAL. PROGRAMA "PAINT A GATE"

Pac.	día 0	1 día	3 días	5 días	7 días	día 0	1 día	3 días	5 días	7 días
1	93*	87	97	99	93	13.3**	10.2	14.6	23.0	22.9
4	99	97	99	87	-	28.4	16.7	22.4	14.7	-
5	99	96	98	-	97	24.4	25.6	13.9	-	15.7
7	97	93	93	-	97	28.6	14.3	13.5	-	22.2
8	99	98	96	-	100	18.4	25.6	14.2	-	117.0
9	92	96	93	81	99	18.7	25.6	27.9	16.5	33.3
10	95	97	95	95	96	21.7	13.4	32.2	22.5	35.4
13	90	83	88	-	92	18.6	43.4	18.1	-	17.7
14	95	79	80	97	91	63.6	34.6	18.3	25.1	22.5
15	99	100	95	-	-	20.6	21.5	12.1	-	-
16	82	93	95	97	97	29.4	31.9	41.5	37.7	40.7
18	95	84	94	90	99	20.5	23.0	19.3	19.1	31.9
20	98	73	87	75	96	31.4	15.1	24.7	14.9	26.5
21	97	96	95	96	90	16.1	12.2	11.8	14.6	12.5
22	96	93	94	-	95	17.2	15.7	6.3	-	85.2
26	90	90	98	74	94	15.6	13.3	14.0	11.0	23.7
27	95	80	91	82	92	26.9	25.2	21.2	20.7	32.5
32	91	84	90	94	99	22.9	11.5	14.8	17.5	21.8
33	91	97	-	-	-	12.5	44.8	-	-	-
34	99	97	93	94	97	44.5	28.8	17.5	22.4	21.2
35	99	99	83	92	-	18.1	32.5	13.3	18.9	-
38	83	92	90	97	97	17.2	17.0	18.0	25.5	17.3

n=22	día 0	1 día	3 días	5 días	7 días
*	93.3 ± 7.6 • (82 - 99)	90.6 ± 8.3 (69 - 100)	92.8 ± 4.9 (80 - 99)	89.6 ± 8.2 (74 - 99)	95.6 ± 2.9 (90 - 100)
**	17.4 ± 5.2 • (7.5 - 27.4)	22.8 ± 9.8 (10.2 - 44.8)	18.5 ± 7.7 (6.3 - 41.5)	20.3 ± 6.2 (11.0 - 37.7)	33.3 ± 25.6 (12.5 - 117)
	17.3	22.3	17.5	20.7	23.2

* Porcentaje de expresión. ** Intensidad de fluorescencia

• Media ± D.S. (Rango). Mediana.

Todo ello contrasta con el porcentaje de expresión del receptor de la IL-6 en las células obtenidas inmediatamente tras realizar la selección negativa, que fue de $93.3\% \pm 7.6$ (rango: 67% - 99%).

La media de medias de la intensidad de fluorescencia fue de 22.8 ± 9.8 (rango: 10.2 - 44.8) para las células B, tras 24 horas de cultivo (la mediana de medias fue de 22.3); los valores de la media de medias y de la mediana de medias en el día tres de cultivo fue de 18.5 ± 7.7 (rango: 6.3 - 41.5) y de 17.5 respectivamente; tras cinco días de cultivo de 20.3 ± 6.2 (rango: 11.0 - 37.7) y de 20.7; y después de siete días de cultivo de 33.3 ± 25.6 (rango: 12.5 - 117.0) y 23.2 respectivamente.

10.2. Cultivo con SAC₂

En veinticuatro pacientes se analizó la expresión del receptor de la IL-6 en la superficie de membrana de los linfocitos de la población B purificada, tras permanecer en cultivo uno, tres, cinco y siete días en contacto con el activador policlonal de linfocitos B SAC₂. El procedimiento empleado fue el mismo que se detalla en el apartado anterior.

Empleo del programa "Lysys II"

En todos los casos se objetivó la presencia del receptor de la IL-6 en un 10% a 100% de las células tumorales. Estos resultados proceden de realizar el cálculo matemático de la sustracción de histogramas que efectúa el programa "Lysys II" del citómetro de flujo, por la misma razón que se detalla en el apartado anterior (Tabla 27a).

Tras 24 horas de cultivo en contacto con SAC₂, el $80.3\% \pm 15.9$ (rango: 30% - 100%) de los linfocitos B de las muestras de LLC-B expresaban el receptor de membrana de la IL-6. Tras 72 horas de cultivo y en las mismas condiciones, el $73.1\% \pm 22.9$ (rango: 0 - 96%) de esas células fueron positivas para dicho antígeno de membrana. El día cinco de cultivo, el $59.5\% \pm 27.9$ (rango: 0 - 96%) de los linfocitos tumorales expresaban el receptor de la IL-6 en su membrana, frente al $58.3\% \pm 33.6$ (rango: 0 - 100%) de las células tras siete días de cultivo.

Empleo del programa "Paint a gate"

El porcentaje de células leucémicas con expresión del receptor de la interleucina 6 en la superficie de membrana osciló entre el 77% y el 100%, cuando el análisis se realizó con el programa "Paint a gate" del citómetro de flujo (Tabla 27b). Tras 24 horas de cultivo, en contacto con SAC₂, el 94.0% ± 5.6 (rango: 77% - 99%) de los linfocitos B de las muestras de LLC-B expresaban el receptor de membrana de la IL-6. Tras 72 horas de cultivo y en las mismas condiciones, el 96.0% ± 3.0 (rango: 91% - 100%) de esas células eran positivas para dicho antígeno de membrana. El día cinco de cultivo, el 94.7% ± 5.4 (rango: 79% - 100%) de los linfocitos tumorales expresaban el receptor de la IL-6 en su membrana, frente al 97.0% ± 2.6 (rango: 92% - 100%) de las células tras siete días de cultivo.

La media de medias de la intensidad de fluorescencia fue de 28.3 ± 12.5 (rango: 13.3 - 68.3) para las células B, tras 24 horas de cultivo (la mediana de medias fue de 23.3); los valores de la media de medias y de la mediana de medias en el día tres de cultivo fue de 34.3 ± 18.8 (rango: 5.1 - 107.0) y de 33.4 respectivamente; tras cinco días de cultivo de 36.8 ± 13.0 (rango: 18.9 - 78.2) y de 36.6; después de siete días de cultivo de 44.9 ± 25.1 (rango: 14.8 - 120.0) y 35.9 respectivamente.

Asímismo se determinó, mediante el programa "Paint a gate" del citómetro de flujo, la media de las intensidades de fluorescencia de los controles isotipo utilizados en los diferentes experimentos. Los valores aparecen resumidos en la Tabla 28.

10.3. Cultivo con IL-6, IL-2 o PDB

En tres pacientes se analizó la expresión del receptor de la IL-6 en tres de los pacientes de la serie por los linfocitos leucémicos, tras un cultivo de uno, tres y siete días con IL-6, IL-2 y PDB, de forma aislada.

TABLA 27a. EXPRESIÓN DEL R-IL6 EN LOS LINFOCITOS B DE LA LLC EN CULTIVO CON SAC₂. PROGRAMA "LYSYS II"

Paciente	24 horas	72 horas	5 días	7 días
1	50% (83%)*	55% (85%)	50% (70%)	40% (70%)
4	45% (70%)	25% (40%)	30% (50%)	-
5	45% (84%)	51% (85%)	-	55% (90%)
7	50% (63%)	45% (80%)	-	50% (80%)
8	50% (85%)	55% (85%)	-	85% (100%)
9	65% (90%)	62% (85%)	25% (35%)	0 (0)
10	65% (90%)	65% (90%)	60% (90%)	70% (90%)
13	71% (90%)	55% (90%)	-	30% (55%)
14	50% (85%)	0 (0)	15% (35%)	0 (0)
15	55% (75%)	30% (55%)	-	-
16	80% (95%)	86% (96%)	86% (96%)	80% (95%)
18	50% (90%)	32% (60%)	40% (70%)	20% (30%)
20	55% (100%)	60% (95%)	46% (80%)	65% (90%)
21	55% (85%)	65% (90%)	38% (60%)	30% (45%)
22	50% (86%)	25% (65%)	-	45% (85%)
26	55% (85%)	55% (80%)	2% (10%)	15% (35%)
27	76% (95%)	75% (95%)	65% (95%)	75% (88%)
32	30% (80%)	35% (60%)	30% (50%)	45% (55%)
33	35% (50%)	25%	40% (60%)	0 (0)
34	60% (90%)	60% (80%)	0 (0)	20% (25%)
35	15% (30%)	42% (75%)	30% (61%)	-
38	40% (65%)	40% (45%)	50% (90%)	50% (75%)

n=22	52.1% ± 14.4 **	47.4% ± 19.3	37.9% ± 21.7	40.8% ± 26.4
	(80.3% ± 15.9) *	(73.1% ± 22.9)	(59.5% ± 27.9)	(58.3% ± 33.6)
	15% - 80% •	0 - 86%	0 - 86%	0 - 85%
	(30% - 100%) ••	(0 - 96%)	(0 - 96%)	(0 - 100%)

* Los valores entre paréntesis están calculados realizando la sustracción de histogramas

** Media ± D.S. • Rango.

TABLA 27b. EXPRESIÓN DEL R-IL6 EN LOS LINFOCITOS B DE LA LLC EN CULTIVO CON SAC₂. PROGRAMA "PAINT A GATE"

Pac.	día 0	1 día	3 días	5 días	7 días	día 0	1 día	3 días	5 días	7 días
1	93*	97	97	99	97	13.3**	20.6	34.4	45.5	46.6
2	93	90	-	88	92	15.8	13.5	-	32.7	25.7
4	99	98	99	99	-	28.4	29.7	37.4	36.6	-
5	99	96	99	-	99	24.4	19.4	25.5	-	26.8
7	97	99	98	-	100	28.6	21.0	25.2	-	31.7
8	99	99	92	-	100	18.4	32.3	15.0	-	120.0
9	92	99	99	100	98	18.7	42.0	42.3	43.1	14.8
10	95	98	100	96	95	21.7	33.1	37.0	36.8	43.8
13	90	99	98	-	99	18.6	68.3	35.3	-	33.9
14	95	77	90	98	95	63.6	32.7	27.8	41.7	43.2
15	99	99	97	-	-	20.6	23.8	36.4	-	-
16	82	96	97	92	99	29.4	48.6	107	78.2	73.7
18	95	90	93	96	99	20.5	21.4	32.1	29.9	35.1
20	98	81	91	79	97	31.4	25.3	42.7	33.2	58.1
21	97	98	99	100	98	16.1	16.3	26.6	32.1	30.0
22	96	96	95	-	96	17.2	21.0	5.1	-	94.5
26	90	92	99	93	97	15.6	26.8	33.4	18.9	29.5
27	95	97	96	93	98	26.9	37.6	48.2	38.0	59.2
31	86	92	-	93	92	9.6	13.3	-	26.0	20.4
32	91	88	98	98	100	22.9	17.0	28.4	22.1	38.9
33	91	97	-	-	-	12.5	42.5	-	-	-
34	99	95	91	98	92	44.5	33.8	34.6	46.4	35.7
35	99	91	94	91	-	18.1	20.0	22.6	24.0	-
38	83	93	94	98	98	17.2	20.3	22.8	40.9	36.1
n=22	día 0	1 día	3 días	5 días	7 días					
*	93.3 ± 7.6 • (82 - 99)	94.0 ± 5.6 (77 - 99)	96.0 ± 3.0 (91 - 100)	94.7 ± 5.4 (79 - 100)	97.0 ± 2.6 (92 - 100)					
**	17.4 ± 5.2 • (7.5 - 27.4)	28.3 ± 12.5 (13.3 - 68.3)	34.3 ± 18.8 (5.1 - 107)	36.8 ± 13.0 (18.9 - 78.2)	44.9 ± 2.5 (14.8 - 120)	17.3	23.3	33.4	36.6	35.9

* Porcentaje de expresión. ** Intensidad de fluorescencia
• Media ± D.S. (Rango). Mediana.

TABLA 28. CONTROL ISOTIPO PARA EL ANÁLISIS DEL R-IL6 POR CITOMETRÍA DE FLUJO

	día 0	día 1	día 3	día 5	día 7
basal PE	-	5.9	5.5	6.6	10.5
SAC ₂ PE	-	8.1	10.4	12.6	15.6
basal R-IL6	15.7*	17.5	15.2	16.1	27.2
SAC ₂ R-IL6	15.7	22.3	24.4	28.1	36.7

* Media de medianas de la intensidad de fluorescencia, analizada mediante el programa "Paint a gate".

TABLA 29. EXPRESIÓN DEL R-IL6 EN LOS LINFOCITOS B DE LA LLC EN CONTACTO CON DIFERENTES MITÓGENOS

Mitógeno	día 0	día 1	día 3	día 5	día 7
basal	17.4 - 93%*	22.8 - 91%	18.5 - 97%	20.3 - 90%	33.3 - 96%
SAC2	17.4 - 93%	28.3 - 94%	34.3 - 96%	36.8 - 95%	44.9 - 97%
IL-6	17.4 - 93%	13.4 - 95%	13.7 - 96%	-	15.8 - 96%
IL-2	17.4 - 93%	13.8 - 96%	17.3 - 96%	-	21.5 - 96%
PDB	17.4 - 93%	22.5 - 98%	24.0 - 98%	-	51.7 - 98%

* Media de la intensidad de fluorescencia-porcentaje de expresión.

Cultivo con IL-6

En tres pacientes se analizó la expresión del receptor de la IL-6 en la membrana de superficie de los linfocitos de la población B purificada.

En todos los casos se objetivó la presencia del receptor de la IL-6 en un 20 a 85% de las células tumorales (Tabla 29). Estos resultados proceden de realizar el cálculo matemático de la sustracción de histogramas que efectúa el programa "Lysys II" del citómetro de flujo.

El porcentaje de células leucémicas que expresaban el receptor de la interleucina 6 en la superficie de membrana osciló entre el 91 y el 98%, cuando el análisis se realizó con el programa "Paint a gate" del citómetro de flujo. Tras 24 horas de cultivo, en contacto con IL-6, el $95.0\% \pm 3.6$ (91%, 98%, 96%) de los linfocitos B de las muestras de LLC-B expresaban el receptor de membrana de la IL-6. Tras 72 horas de cultivo, el $95.7\% \pm 0.6$ (95%, 96%, 96%), y el día siete de cultivo, el $96.3\% \pm 2.1$ (97%, 94%, 98%) de los linfocitos tumorales expresaban el receptor de la IL-6 en su membrana.

La media de medias de la intensidad de fluorescencia fue de 14.0 ± 1.0 (13.9, 13.0, 15.0) para las células B, tras 24 horas de cultivo (la mediana de medias fue de 13.0); los valores de la media de medias y de la mediana de medias en el día tres de cultivo fueron de 13.7 ± 1.7 (14.6, 11.7, 14.7) y de 14.6 respectivamente; después de siete días de cultivo dichas cifras fueron de 15.8 ± 2.7 (18.5, 13.1, 15.9) y de 15.9 también respectivamente (Tabla 29).

Cultivo con IL-2

En dos pacientes se analizó la expresión del receptor de la IL-6 en la membrana de superficie de los linfocitos de la población B purificada, tras permanecer en cultivo con IL-2 (a la concentración de 100 U/ml) uno, tres y siete días.

En ambas muestras se trataba de una población uniforme sin buena discriminación frente al valor elegido como negativo. Se objetivó la presencia del receptor de la IL-6, en conjunto, entre un 20% y un 68% de las células tumorales,

resultados que proceden de realizar el cálculo matemático de la sustracción de histogramas ya detallada en los apartados previos.

El porcentaje de expresión del receptor de la interleucina 6 por las células leucémicas osciló entre el 96 y el 98%, cuando el análisis se realizó con el programa "Paint a gate" del citómetro de flujo (Tabla 29). Tras 24 horas de cultivo, en contacto con IL-2, el 96% y el 96% de los linfocitos B de las muestras de LLC-B expresaban el receptor de membrana de la IL-6; fue de 96% y 97% tras 72 horas; y de 97% y 96% tras siete días en cultivo.

Las medias de la intensidad de fluorescencia fueron de 12.9 y 14.8 para las células B, tras 24 horas de cultivo; estos valores en el día tres de cultivo fueron de 18.6 y 16.0; después de siete días de cultivo dichas cifras fueron de 19.0 y 21.5 (Tabla 29).

Cultivo con PDB

En un paciente se analizó la expresión del receptor de la IL-6 en la membrana de superficie de los linfocitos de la población B purificada, tras permanecer en cultivo con PDB uno, tres y siete días, que fue del 98% de las células estudiadas en los tres tiempos de cultivo, cuando el análisis se realizó con el programa "Paint a gate" del citómetro de flujo (Tabla 29).

La intensidad de fluorescencia de dicho antígeno de membrana en esos mismos días de cultivo fue de 22.5, 24.0 y 51.7, respectivamente (Tabla 29).

11. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ACTIVACIÓN (CD25) Y PROLIFERACIÓN (CD71) EN LA MEMBRANA DE SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS B LEUCÉMICOS EN CULTIVO

Se realizó el análisis de la expresión de la cadena alfa del receptor de la interleucina 2 (antígeno de activación CD25) y del antígeno de proliferación CD71

en la membrana de las células leucémicas que se habían mantenido en cultivo, bien en situación basal o en contacto con SAC₂, durante uno, tres, cinco y siete días.

11.1. Cultivo en situación basal

En dieciséis pacientes se estudió la expresión del antígeno CD25 y del CD71 en la membrana de los linfocitos B leucémicos, en situación basal y tras uno, tres, cinco y siete días de cultivo, mediante citometría de flujo y utilizando triple marcaje (CD71 FITC, CD25 PE, CD19 TC). El análisis se realizó sobre la población de células CD19 (+), provenientes de las muestras leucémicas purificadas.

11.1.a. Expresión del CD25

El estudio se llevó a cabo mediante los programas "Lysys II" y "Paint a gate" del citómetro de flujo.

Empleo del programa "Lysys II"

Se objetivó la presencia del CD25 entre un 0 y un 100% de las células tumorales, nada más ser extraídas del paciente (media \pm D.S.: 78.4% \pm 28.4; mediana: 90%). Estos resultados proceden de realizar el cálculo matemático de la sustracción de histogramas que efectúa el programa "Lysys II" del citómetro de flujo. De la misma forma que lo observado en el caso de la expresión del receptor de la IL-6, se trataba de una población celular uniforme sin una buena discriminación frente al valor elegido como negativo, por su baja densidad antigénica en la superficie de membrana.

Tras 24 horas de cultivo sin contacto con mitógenos, el 90.1% \pm 22.8 (rango: 15% - 100%; mediana: 97.5%) de los linfocitos B de las muestras de LLC-B expresaban el CD25; tras 72 horas de cultivo, el 72.4% \pm 26.4 (rango: 3% - 100%; mediana: 98%) de esas células eran positivas para dicho antígeno de membrana; el día cinco de cultivo, el 84.6% \pm 30.9 (rango: 5% - 100%; mediana: 96%) de los

linfocitos tumorales expresaban el CD25 en su membrana, frente al $84.7\% \pm 29.9$ (rango: 0 - 100%; mediana: 95%) de las células tras siete días de cultivo (Tabla 30a).

Empleo del programa "Paint a gate"

El porcentaje de células leucémicas que expresaban el CD25 en su superficie de membrana osciló entre el 0 y el 100%, cuando el análisis se realizó con el programa "Paint a gate" del citómetro de flujo.

Tras 24 horas de cultivo sin contacto con mitógenos, el $92.3\% \pm 23.9$ (rango: 0 - 100%; mediana: 98%) de los linfocitos B de las muestras de LLC-B expresaban el CD25. Tras 72 horas de cultivo y en las mismas condiciones, el $92.4\% \pm 24.7$ (rango: 0 - 100%; mediana: 99%) de esas células eran positivas para dicho antígeno de membrana. El día cinco de cultivo, el $87.3\% \pm 32.8$ (rango: 0 - 100%; mediana: 99%) de los linfocitos tumorales expresaban el CD25 en su membrana, frente al $92.5\% \pm 24.7$ (rango: 0 - 100%; mediana: 100%) de las células tras siete días de cultivo.

La media de medias de la intensidad de fluorescencia fue de 41.7 ± 26.0 (rango: 12.8 - 109.0) para las células B, tras 24 horas de cultivo (la mediana de medias fue de 30.5); los valores de la media de medias y de la mediana de medias en el día tres de cultivo fue de 40.1 ± 28.7 (rango: 9.8 - 124.0) y de 31.4 respectivamente; tras cinco días de cultivo de 40.9 ± 29.5 (rango: 7.3 - 114.0) y de 38.2; y después de siete días de cultivo de 64.4 ± 78.6 (rango: 6.6 - 304.0) y 30.5 respectivamente (Tabla 30b).

11.1.b. Expresión del CD71

El estudio se llevó a cabo mediante el programa "Paint a gate" del citómetro de flujo. Ninguna de las células leucémicas de las dieciséis muestras analizadas expresó el antígeno CD71 en ninguno de los días de cultivo, sin contacto con ningún mitógeno.

La media de medias de la intensidad de fluorescencia fue de 10.3 ± 6.2 (rango: 3.9 - 28.7), para las células B, tras 24 horas de cultivo (la mediana de medias fue de 7.8); los valores de la media de medias y de la mediana de medias en el día tres de cultivo fue de 7.4 ± 2.9 (rango: 2.4 - 12.5) y de 7.4

respectivamente; tras cinco días de cultivo de 8.0 ± 2.2 (rango: 4.6 - 11.3) y de 7.5; y después de siete días de cultivo de 13.9 ± 11.1 (rango: 3.9 - 49.6) y 11.7 respectivamente (Tabla 31).

11.2. Cultivo con SAC₂

En dieciséis pacientes se analizó la expresión del antígeno CD25 y del CD71 en la membrana de los linfocitos de la población B purificada, tras permanecer en cultivo uno, tres, cinco y siete días en contacto con el activador policlonal de linfocitos B SAC₂. El procedimiento empleado fue el mismo que se detalla en el apartado anterior.

11.2.a. Expresión del CD25

El estudio se llevó a cabo mediante los programas "Lysys II" y "Paint a gate" del citómetro de flujo.

Empleo del programa "Lysys II"

Se objetivó la presencia del CD25 entre un 0 y 100% de las células tumorales. Estos resultados proceden de realizar el cálculo matemático de la sustracción de histogramas que efectúa el programa "Lysys II" del citómetro de flujo.

Tras 24 horas de cultivo en contacto con SAC₂, el $96.2\% \pm 6.7$ (rango: 75% - 100%; mediana: 98%) de los linfocitos B de las muestras de LLC-B expresaban el CD25. Tras 72 horas de cultivo y en las mismas condiciones, el $97.2\% \pm 3.1$ (rango: 93% - 100%; mediana: 97.5%) de esas células eran positivas para dicho antígeno de membrana. El día cinco de cultivo, el $91.3\% \pm 9.1$ (rango: 75% - 100%; mediana: 94%) de los linfocitos tumorales expresaban el CD25 en su membrana, frente al $77.0\% \pm 30.0$ (rango: 0 - 100%; mediana: 94%) de las células tras siete días de cultivo (Tabla 32a).

TABLA 30. EXPRESIÓN DEL CD25 EN LAS CÉLULAS B LEUCÉMICAS EN CULTIVO EN SITUACIÓN BASAL

a) Programa "Lysys II"

Muestras n=14	día 0	24 horas	72 horas	5 días	7 días
media ± D.S.	51.3% ± 26.3 (78.4±28.4)*	69.7% ± 28.1 (90.1 ± 22.8)	72.4% ± 26.4 (90.1 ± 22.0)	67.9% ± 32.1 (84.6 ± 30.9)	68.8% ± 30.6 (84.7 ± 29.9)
rango	0 - 95% (0 - 100%)	10 - 96% (15% - 100%)	3% - 96% (3% - 100%)	5% - 98% (20% - 100%)	0 - 98% (0 - 100%)
mediana	60% (90.0%)	75% (97.5%)	75% (98%)	80% (96%)	80% (95%)

* Los valores entre paréntesis corresponden a los resultados obtenidos con el cálculo matemático de la sustracción de histogramas.

b) Programa "Paint a gate"

Muestras n=14	día 0	24 horas	72 horas	5 días	7 días
Porcentaje de expresión	89.6%±30.6* (0 - 100%) 100%	92.3% ± 23.9 (0 - 100%) 98%	92.4% ± 24.7 (0 - 100%) 99%	87.3% ± 32.8 (0 - 100%) 99%	92.5% ± 24.7 (0 - 100%) 100%
Intensidad de fluores- cencia.	22.8 ± 11.7 (5.8 - 41.7) 25.5	41.7 ± 26.0 (12.8 - 109) 30.5	40.1 ± 28.7 (9.8 - 124.0) 31.4	40.9 ± 29.5 (7.3 - 114.0) 38.2	64.4 ± 78.6 (6.6 - 304.0) 30.5

* Media ± D.S. (Rango). Mediana.

TABLA 31. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DEL ANTÍGENO CD71 EN CÉLULAS B LEUCÉMICAS EN CULTIVO

Muestras n=16	día 0	24 horas	72 horas	5 días	7 días
Basal	8.6 ± 3.28* (4.3 - 16.2)	10.3 ± 6.2 (3.9 - 28.7)	7.4 ± 2.9 (2.4 - 12.5)	8.0 ± 2.2 (4.6 - 11.3)	13.9 ± 11.1 (3.9 - 49.6)
	8.1	7.8	7.4	7.5	11.7
SAC ₂	8.6 ± 3.28 (4.3 - 16.2)	205.8 ± 181 (22.4- 656.1)	222.8±205.1 (28.6- 800.0)	227.8±216.4 (69.8- 811.0)	271.2±317.1 (22.3 - 1242)
	8.1	146.5	157.0	153.0	182.0

* Media ± D.S. (rango). Mediana. Resultados con "Paint a gate".

TABLA 32. EXPRESIÓN DEL CD25 EN LAS CÉLULAS B LEUCÉMICAS EN CULTIVO CON SAC₂

a) Programa "Lysys II"

Muestras n=14	día 0	24 horas	72 horas	5 días	7 días
media ± D.S.	51.3% ± 26.3 (78.4± 28.4)*	81.1% ± 17.8 (96.2 ± 6.7)	81.6% ± 12.5 (97.2 ± 3.1)	75.3% ± 18.1 (91.3 ± 9.1)	60.2% ± 34.1 (77.0 ± 30.0)
rango	0 - 95% (0 - 100%)	35 - 97% (75% - 100%)	60 - 97% (93% - 100%)	55 - 97% (75% - 100%)	0 - 95% (0 - 100%)
mediana	60% (90%)	86.5% (98%)	82% (97.5%)	78.5% (94%)	71% (94%)

* Los valores entre paréntesis corresponden a los resultados obtenidos con el cálculo matemático de la sustracción de histogramas.

b) Programa "Paint a gate"

Muestras n=14	día 0	24 horas	72 horas	5 días	7 días
Porcentaje de expresión	89.6%±30.6* (0 - 100%) 100%	97.1% ± 2.8 (90% - 100%) 98%	97.7% ± 1.6 (94% - 100%) 98%	97.9% ± 2.5 (93% - 100%) 99%	98.4% ± 2.3 (91% - 100%) 99%
Intensidad de fluores- cencia.	22.8 ± 11.7 (5.8 - 41.7) 25.5	100.3 ± 68.0 (31.6 - 255) 79.5	86.2 ± 64.0 (9.7 - 224.0) 58.2	99.6 ± 57.3 (31.5- 224.0) 71.45	121.4 ± 122 (13.6 - 463) 71.1

* Media ± D.S. (Rango). Mediana.

Empleo del programa "Paint a gate"

El porcentaje de células leucémicas con expresión del CD25 en la superficie de membrana osciló entre el 0 y el 100%, cuando el análisis se realizó con el programa "Paint a gate" del citómetro de flujo.

Tras 24 horas de cultivo en contacto con SAC₂, el 97.1% ± 2.8 (rango: 90% - 100%; mediana: 98%) de los linfocitos B de las muestras de LLC-B expresaban el CD25. Tras 72 horas de cultivo, el 97.7% ± 1.6 (rango: 94% - 100%; mediana: 98%) de las células eran positivas para dicho antígeno de membrana. El día cinco de cultivo, el 97.9% ± 2.5 (rango: 93% - 100%; mediana: 99%) de los linfocitos tumorales expresaban el CD25 en su membrana, frente al 98.4% ± 2.3 (rango: 91% - 100%; mediana: 99%) de las células tras siete días de cultivo (Tabla 32b).

La media de medias de la intensidad de fluorescencia fue de 100.3 ± 68.0 (rango: 31.6 - 255.0) para las células B, tras 24 horas de cultivo (la mediana de medias fue de 79.5); los valores de la media de medias y de la mediana de medias en el día tres de cultivo fueron de 86.2 ± 64.0 (rango: 9.7 - 224.0) y de 58.2 respectivamente; tras cinco días de cultivo de 99.6 ± 57.3 (rango: 31.5 - 224.0) y de 71.45; después de siete días de cultivo de 121.4 ± 121.9 (rango: 13.6 - 463.0) y 71.1 respectivamente (Tabla 32b).

11.2.b. Expresión del CD71

El estudio se llevó a cabo mediante el programa "Paint a gate" del citómetro de flujo.

La media de medias de la intensidad de fluorescencia fue de 205.8 ± 181.0 (rango: 22.4 - 656.0), para las células B, tras 24 horas de cultivo (la mediana de medias fue de 146.5); los valores de la media de medias y de la mediana de medias en el día tres de cultivo fue de 222.8 ± 205.1 (rango: 28.6 - 800.0) y de 157.0 respectivamente; tras cinco días de cultivo ambos valores fueron de 227.8 ± 216.5 (rango: 69.8 - 811.0) y de 153.0; después de siete días de cultivo de 271.2 ± 316.8 (rango: 22.3 - 1242.0) y 182.0 respectivamente (Tabla 31).

Se objetivó un aumento importante de la intensidad de fluorescencia con respecto a esas mismas poblaciones celulares en situación basal. Todos los valores presentaron una desviación típica superior al 100%.

12. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR

Este estudio se practicó en las células leucémicas en el día cero y tras cultivo de uno, tres, cinco y siete días de duración.

12.1. Viabilidad de la muestra en el día cero

En las treinta y nueve muestras de linfocitos B purificados de esta serie, se estudió la viabilidad celular en el momento de iniciar los cultivos, una vez realizada la selección negativa con AET. El análisis se llevó a cabo con azul tripán -para posterior estudio con el microscopio óptico-, y con yoduro de propidio -para el estudio con el citómetro de flujo-. Con ambas técnicas se obtuvieron resultados similares. El porcentaje de células no viables junto con las células en apoptosis osciló entre el 0% y el 40% del total de la población (media \pm D.S.: 4.5% \pm 7.9). En el caso del paciente con la proporción más pequeña de células vivas (60% del total), las células que tenían características de muertas constituían el 28% del total, mientras que aquellas que presentaban rasgos de estar en apoptosis según el análisis de citometría alcanzaban el 12% del total de esa muestra (Tabla 33).

12.2. Viabilidad de las células en cultivo

En veintitrés de las muestras anteriores se estudió también la viabilidad celular cuando los linfocitos B leucémicos se mantenían en cultivo, tanto en situación basal como en contacto con SAC₂, durante un periodo de tiempo de uno,

tres, cinco y siete días. El análisis se practicó con el empleo de ioduro de propidio y el citómetro de flujo.

12.2.a. Viabilidad de las células en situación basal

El porcentaje de células viables en los cultivos en los que no se había utilizado SAC₂ osciló dependiendo del día de cultivo en que se realizó el análisis. Tras veinticuatro horas en cultivo, el porcentaje de células muertas y en apoptosis estuvo comprendido entre el 1% y el 51% (media \pm D.S.: 21.5% \pm 17.6); tras tres días de cultivo, osciló entre el 4% y el 71% (31.9% \pm 21.0); después de cinco días de cultivo entre el 1% y el 77% (32.2% \pm 22.6); y en el séptimo día entre el 0 y el 62% (20.0% \pm 16.5) (Tabla 33).

12.2.b. Viabilidad de las células en contacto con SAC₂

Cuando se empleó SAC₂ en el cultivo, los porcentajes de células no viables estuvieron comprendidos entre el 1% y el 44% (media \pm D.S.: 16.6% \pm 14.8) -día uno-; entre el 0 y el 86% (31.1% \pm 26.2) -día tres-; entre el 4% y el 85% (34.2% \pm 28.0) -día cinco-; entre el 0 y el 90% (33.8% \pm 27.6) -día siete- (Tabla 34).

La intensidad de fluorescencia de los antígenos de membrana de las células con características de apoptosis fue en todos los casos inferior a los valores objetivados en las células viables. Así, la media de la intensidad de fluorescencia en las células B tras 24 horas en cultivo, para el antígeno CD45 FITC fue de 126.5 \pm 49.7 (para las células viables) y de 47.9 \pm 21.5 (para las células en apoptosis); para el antígeno CD19 FITC, en las mismas circunstancias, los resultados fueron de 63.8 \pm 22.9 y de 36.2 \pm 9.4, respectivamente; para el CD5 FITC, de 56.6 \pm 26.9 y 21.9 \pm 9.7; para el CD19 TC, de 396.6 \pm 194.1 y 157.5 \pm 77.6; para el CD5 TC, de 312.4 \pm 178.6 y 170.6 \pm 105.6; para el CD25, de 43.6 \pm 22.8 y 21.6 \pm 20.7. Sólo en el caso de la determinación del R-IL6 mediante el empleo de la IL-6 conjugada con PE, la intensidad de fluorescencia fue superior en las células en apoptosis (26.3 \pm 10.8, en las mismas circunstancias descritas previamente) que en las células viables. Por último, la intensidad de fluorescencia para los controles isotipo de los anticuerpos monoclonales conjugados con FITC, PE y TC, fue mayor en las células en apoptosis que en las células viables: 9.3 \pm 3.9 frente a 3.4 \pm 1.5, 11.6 \pm 3.0 frente a 4.8 \pm 1.2, y 37.7 \pm 30.1 frente a 7.5 \pm 5.2 (Figuras 28 y 29).

TABLA 33. PORCENTAJE DE CÉLULAS B EN CULTIVO NO VIABLES EN SITUACIÓN BASAL

Paciente	día 0	24 horas	72 horas	5 días	7 días
1	3%	-	6%	18%	25%
2	4%	-	-	-	-
3	2%	-	-	-	-
4	10%	51%	61%	65%	-
5	0%	5%	14%	-	8%
6	-	-	-	-	-
7	0%	7%	50%	-	13%
8	1%	15%	42%	-	37%
9	0%	13%	10%	15%	10%
10	0%	20%	19%	23%	19%
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	26%	13%	-	32%
14	12%	15%	33%	39%	28%
15	5%	14%	61%	-	-
16	0%	51%	63%	62%	62%
17	-	-	-	-	-
18	2%	3%	4%	1%	0%
19	-	-	-	-	-
20	4%	17%	14%	6%	0%
21	0%	6%	18%	13%	13%
22	3%	7%	33%	-	36%
23	2%	-	-	-	-
24	3%	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-
26	0%	4%	15%	37%	0%
27	3%	34%	35%	19%	5%
28	1%	-	-	-	-
29	1%	-	-	-	-
30	1%	-	-	-	-
31	1%	-	-	-	-
32	5%	-	34%	33%	21%
33	6%	51%	65%	77%	46%
34	40%	49%	71%	47%	19%
35	12%	40%	45%	54%	-
36	2%	-	-	-	-
37	2%	-	-	-	-
38	0%	1%	6%	6%	6%
39	2%	-	-	-	-
n=22	4.0±7.2* (0 - 40%)	21.5±17.6 (1% - 51%)	31.9±21.0 (4% - 71%)	32.2±22.6 (1% - 77%)	20.0±16.5 (0 - 62%)

* Media ± D.S. (rango).

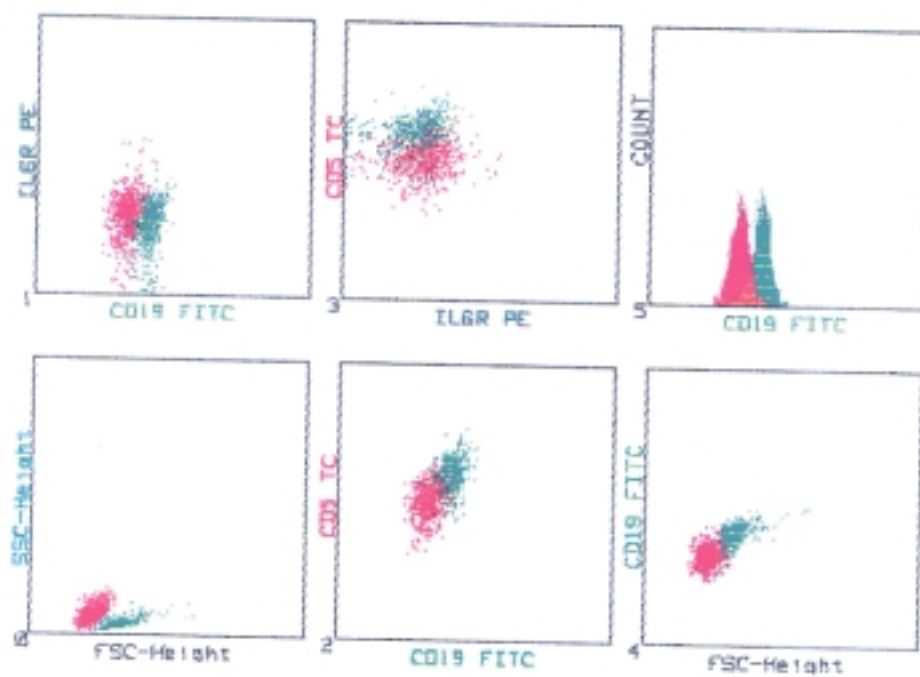
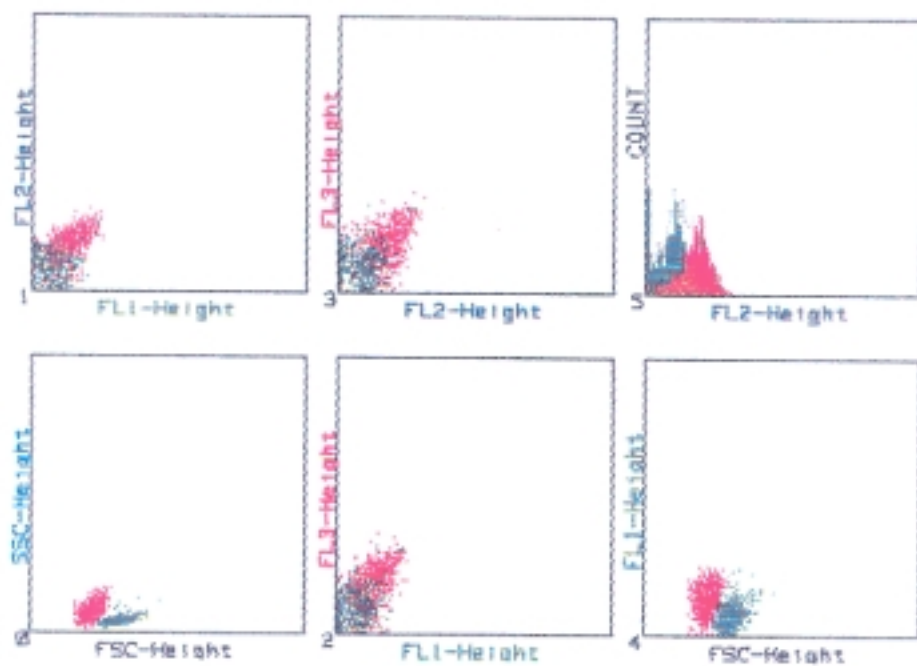
TABLA 34. PORCENTAJE DE CÉLULAS B NO VIABLES EN CULTIVO CON SAC₂

Paciente	día 0	24 horas	72 horas	5 días	7 días
1	3%	5%	0%	4%	8%
2	4%	30%	-	38%	-
3	2%	-	-	-	-
4	10%	44%	62%	61%	-
5	0%	8%	7%	-	13%
6	-	-	-	-	-
7	0%	7%	44%	-	30%
8	1%	6%	-	-	66%
9	0%	7%	7%	24%	0%
10	0%	16%	19%	19%	32%
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13		27%	13%	-	43%
14	12%	8%	12%	5%	16%
15	5%	8%	29%	-	-
16	0%	42%	60%	62%	55%
17	-	-	-	-	-
18	2%	3%	4%	5%	4%
19	-	-	-	-	-
20	4%	9%	40%	40%	45%
21	0%	4%	16%	12%	10%
22	3%	4%	-	-	29%
23	2%	-	-	-	-
24	3%	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-
26	0%	3%	7%	9%	12%
27	3%	27%	20%	14%	25%
28	1%	-	-	-	-
29	1%	-	-	-	-
30	1%	-	-	-	-
31	1%	7%	-	17%	-
32	5%	-	77%	85%	90%
33	6%	29%	57%	73%	71%
34	40%	44%	86%	83%	87%
35	12%	42%	57%	58%	-
36	2%	-	-	-	-
37	2%	-	-	-	-
38	0%	1%	6%	6%	6%
39	2%	-	-	-	-
n=22	4.0±7.2* (0 - 40%)	16.6±14.8 (1% - 44%)	31.1±26.2 (0 - 86%)	34.2±28.0 (4% - 85%)	33.8±27.6 (0 - 90%)

* Media ± D.S. (rango).

FIGURA 28. Análisis por "Paint a gate" de la población leucémica purificada en cultivo. Control isotipo en las células viables y en las que han sufrido apoptosis

FIGURA 29. Análisis por "Paint a gate" de la población leucémica purificada en cultivo. Expresión del CD19 (FITC), CD5 (PE), HLA-DR (TC) en las células viables y en las que han sufrido apoptosis



13. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

En seis pacientes se estudió la morfología del ciclo celular de las células B purificadas, tanto en el día cero (día de la extracción de la muestra), como tras permanecer en medio de cultivo durante tres y siete días, bien en situación basal o en combinación con varios mitógenos.

13.1. Análisis del ciclo celular en el día cero

Se estudió el ciclo celular de las seis muestras tras obtener las células purificadas con AET. El análisis se llevó a cabo sobre la población celular viable con el programa "Cell fit" del citómetro de flujo.

El porcentaje de células en la fase G₁ fue del 92.9% ± 1.27 (rango: 92.0% - 93.8%); en fase S fue del 3.5% ± 1.41 (rango: 2.5% - 5.5%); y en fase G₂/M de 3.5% ± 2.6 (rango: 1.7% - 5.4%).

13.2. Análisis del ciclo celular en el día tres

Después de la obtención de las células tras tres días de cultivo, se realizó el mismo análisis que el detallado en el apartado anterior. Se consiguieron células en situación basal y en contacto con IL-6 recombinante (a las dosis de 20, 10 y 1 ng/ml) -sola o en combinación con el éster del forbol (PDB)-, IL-2 (a dosis de 100 U/ml) -sola o en combinación con el PDB-, PDB aislado, PHA y SAC₂.

Salvo los resultados obtenidos con la PHA {fase G₁ de 74.3% ± 3.0 (rango: 71.3% - 77.3%); fase S de 20.0% ± 4.6 (rango: 15.3% - 24.6%); fase G₂/M de 5.7% ± 4.1 (rango: 2.6% - 10.3%)}, el resto no varían de forma sustancial de los objetivados en el día cero (Tabla 35).

13.3. Análisis del ciclo celular en el día siete

Se realizó en células leucémicas tras siete días de cultivo. Los mitógenos empleados, sus combinaciones y sus dosis fueron las mismas que las del apartado anterior.

Los resultados obtenidos con la PHA {fase G₁ de 77.0% ± 3.7 (rango: 72.8% - 79.9%); fase S de 20.1% ± 4.1 (rango: 17.9% - 25.0%); fase G₂/M de 2.7% ± 0.9 (rango: 2.2% - 3.7%)} y el SAC₂ {fase G₁ de 80.7% ± 14.2 (rango: 70.7% - 90.8%); fase S de 18.8% ± 14.6 (rango: 8.5% - 29.1%); fase G₂/M de 0.4% ± 0.3 (rango: 0.2% - 0.7%)}, fueron diferentes a los del resto de los mitógenos empleados (Tabla 36).

TABLA 35. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR DE LAS CÉLULAS B LEUCÉMICAS EN EL DÍA TRES DE CULTIVO

Mitógeno	Fase G ₀ /G ₁	Fase S	Fase G ₂ /M
Basal	95.0% ± 2.1* (93.5% - 96.5%)	4.1% ± 1.6 (3.0-5.3)	0.8% ± 0.5 (0.5% - 1.2%)
IL-6 20 ng/ml	94.5% ± 2.8 (92.5% - 96.5%)	4.6% ± 2.7 (2.7% - 6.5%)	0.9% ± 0.1 (0.8% - 1.0%)
IL-6 10 ng/ml	-	-	-
IL-6 1 ng/ml	94.9% ± 0.8 (94.4% - 95.5%)	3.8% ± 0.8 (3.3% - 4.4%)	1.1% ± 0.1 (1.0% - 1.2%)
IL-6 20 ng/ml +PDB	94.8% ± 1.8 (93.5% - 96.1%)	4.7% ± 2.2 (3.2% - 6.3%)	0.4% ± 0.3 (0.2% - 0.7%)
IL-6 10 ng/ml +PDB	95.0% ± 0.3 (94.8% - 95.2%)	4.5% ± 0.3 (4.4% - 4.6%)	0.5% ± 0.3 (0.4% - 0.6%)
IL-6 1 ng/ml +PDB	95.1% ± 0.2 (95.3% - 95.0%)	4.4% ± 0.2 (4.3% - 4.6%)	0.6% ± 0.2 (0.7% - 0.4%)
IL-2 100 U/ml	93.6% ± 6.0 (89.4% - 97.9%)	6.1% ± 6.0 (1.9% - 10.4%)	0.1% ± 0.1 (0.1% - 0.2%)
IL-2 100 U/ml + PDB	96.3% ± 2.0 (97.8% - 94.9%)	1.8% ± 0.2 (1.7% - 2.0%)	0.6% ± 0.2 (0.5% - 0.8%)
PDB	96.0% ± 1.9 (94.7% - 97.4%)	3.6% ± 1.9 (2.3% - 5.0%)	0.4% ± 0.2 (0.3% - 0.5%)
PHA	74.3% ± 3.0 (71.3% - 77.3%)	20.0% ± 4.6 (15.3% - 24.6%)	5.7% ± 4.1 (2.6% - 10.3%)
SAC ₂	92.4% ± 4.2 (89.5% - 95.4%)	4.7% ± 1.3 (3.8% - 5.7%)	1.0% ± 0.3 (0.8% - 1.2%)

* Media ± D.S. (Rango).

TABLA 36. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR DE LAS CÉLULAS B LEUCÉMICAS EN EL DÍA SIETE DE CULTIVO

Mitógeno	Fase G ₀ /G ₁	Fase S	Fase G ₂ /M
Basal	96.6% ± 3.0 (94.5% - 98.8%)	3.0% ± 2.4 (0.2% - 4.5%)	0.9% ± 0.1 (0.8% - 1.1%)
IL-6 20 ng/ml	95.0% ± 1.5 (94.0% - 96.7%)	3.4% ± 0.1 (3.3% - 3.5%)	1.8% ± 1.1 (1.0% - 2.6%)
IL-6 10 ng/ml	96.5% ± 0.0 (96.5%)	1.9% ± 0.0 (1.9%)	1.6% ± 0.0 (1.6%)
IL-6 1 ng/ml	85.0% ± 0.0 (85.0%)	12.4% ± 0.0 (12.4%)	2.6% ± 0.0 (2.6%)
IL-6 20 ng/ml +PDB	96.0% ± 0.8 (95.4% - 96.6%)	3.0% ± 1.1 (2.2% - 3.8%)	1.0% ± 0.4 (0.7% - 1.3%)
IL-6 10 ng/ml +PDB	96.1% ± 0.0 (96.1%)	3.6% ± 0.0 (3.6%)	0.3% ± 0.0 (0.3%)
IL-6 1 ng/ml +PDB	96.3% ± 0.0 (96.3%)	3.4% ± 0.0 (3.4%)	0.3% ± 0.0 (0.3%)
IL-2 100 U/ml	94.6% ± 0.2 (94.5% - 94.8%)	4.0% ± 0.1 (4.0% - 4.1%)	1.2% ± 0.2 (1.1% - 1.4%)
IL-2 100 U/ml + PDB	94.6% ± 0.0 (94.6%)	3.4% ± 0.0 (3.4%)	2.0% ± 0.0 (2.0%)
PDB	95.2% ± 0.8 (94.3% - 95.9%)	4.0% ± 0.3 (3.8% - 4.3%)	0.8% ± 1.0 (0.2% - 1.9%)
PHA	77.0% ± 3.7 (72.8% - 79.9%)	20.1% ± 4.1 (17.9% - 25%)	2.7% ± 0.9 (2.2% - 3.7%)
SAC ₂	80.7% ± 14.2 (70.7% - 90.8%)	18.8% ± 14.6 (8.5% - 29.1%)	0.4% ± 0.3 (0.2% - 0.7%)

* Media ± D.S. (Rango).

DISCUSIÓN

La LLC-B es una enfermedad linfoproliferativa crónica de células B, y constituye la leucemia con mayor incidencia en los países occidentales. Las manifestaciones clínicas y el curso de la enfermedad varía de unos pacientes a otros, y a pesar de los sistemas de estadiaje actuales, es difícil pronosticar el curso individual de la enfermedad (Montserrat, 1992).

Existe la convicción de que factores solubles pueden jugar un papel relevante en la patogénesis y/o en el curso clínico de varias neoplasias hematológicas, entre ellas la LLC-B. La investigación de las citocinas relacionadas con la función de los linfocitos B y la expresión de sus receptores en las células de la LLC-B puede ayudar a conocer la conexión existente entre estos factores y la transformación leucémica. Entre las citocinas estudiadas en relación a esta enfermedad, las que han sido objeto de un análisis más exhaustivo en los últimos años son el $\text{TNF}\alpha$, la IL-2 y la IL-4. A las dos primeras se les ha atribuido una acción positiva, y a la IL-4 un efecto negativo sobre la proliferación celular leucémica, si bien de forma inconsistente (Álvarez-Mon y col., 1989; Luo y col., 1991; Trentin y col., 1993; Reittie y Hoffbrand, 1994; Tsilivakos y col., 1994). En relación a la IL-6 son escasos los trabajos publicados, siendo los resultados contradictorios en su mayoría (Biondi y col., 1989; Caligaris-Cappio y col., 1989; Carlsson y col., 1989; Freeman y col., 1989; Digel y col., 1991; Van Kooten y col., 1992; Burke y col., 1993; Jewell y col., 1993; Plate y col., 1993_b; Aderka y col., 1993; Rambaldi y col., 1993).

Hay que tener en cuenta además, que debido a la redundancia y al pleiotropismo de las citocinas, unas pueden influir y modificar la acción de las restantes, pudiendo intervenir de este modo múltiples citocinas en la patogénesis de una enfermedad. En la Introducción se ha descrito la acción de las distintas citocinas sobre las células de estirpe B de la LLC-B. Así, la IL-7 estimula la expresión de los receptores de la IL-2 y los del $\text{TNF}\alpha$ en la LLC-B (Plate y col., 1993_b); la IL-2 incrementa la expresión del receptor de la IL-3 (Trentin y col., 1994) y la secreción del $\text{TNF}\alpha$ (Larsson y col., 1993); el $\text{TGF}\beta$ inhibe la producción de la IL-6 por las células del estroma (Lagneaux y col., 1992); la IL-4 aumenta la expresión de la cadena alfa del R-IL2 (Shubinsky y col., 1994) y tiene un efecto negativo sobre la proliferación celular leucémica inducida por el $\text{TNF}\alpha$ (Van Kooten y col., 1992), por el $\text{IFN}\gamma$ (Karray y col., 1988_c), o por la IL-2 (Karray y col., 1988_a); el $\text{IFN}\alpha$ contrarresta la acción del $\text{TNF}\alpha$, también en la LLC-B (Cordingley y col., 1988); la IL-10 permite la respuesta de los linfocitos B neoplásicos a la IL-2 a través de la inducción de los

receptores de alta afinidad de la IL-2 en esas células (Fluckiger y col., 1993). Además, hay que tener presente que estas citocinas pueden realizar su acción sobre la población de células T, la cual será a su vez origen de una nueva producción de estos factores solubles, que ejercerán su función sobre las células B leucémicas. También existe la posibilidad de que una variedad de citocinas (IFN γ , IFN α , IL-2, TNF α , GM-CSF, M-CSF) puedan estimular la lisis de células tumorales dependiente de anticuerpos, como se ha demostrado en las CMSP de personas sanas (Cemerlic y col., 1991). Por último, dentro de la heterogeneidad de la enfermedad, no se debe olvidar la posibilidad de que unas citocinas sean las responsables de la génesis de la LLC-B en unos pacientes, y que otras lo sean en otros. De los trabajos publicados hasta el momento no se puede extraer un esquema claro del papel específico que tienen esas citocinas o sus receptores en la proliferación de las células B leucémicas en la LLC-B y en la progresión de la enfermedad.

Esta Tesis ha intentado profundizar en el papel de la IL-6 en la LLC-B, analizando si esta citocina se comporta de modo parecido o no a como lo hace en el mieloma múltiple (Kawano y col., 1988); es decir, si la IL-6 es o no un factor autocrino en el desarrollo de la LLC-B. Para ello, se han fijado unos objetivos ya detallados en otro capítulo de este estudio, que han incluido el estudio fenotípico de las células de la LLC-B (con atención específica en la expresión del receptor de la IL-6 en su membrana), el análisis de la acción de la IL-6 (así como de la IL-2 y un éster del forbol) sobre la proliferación y la diferenciación de los linfocitos B leucémicos, y la determinación de la producción de dicha citocina y de su receptor soluble por parte de las células neoplásicas de la LLC-B.

En este trabajo se han analizado treinta y nueve pacientes diagnosticados de LLC-B, veinticinco mujeres y catorce varones, que no habían recibido tratamiento previo a la realización de este estudio, recopilando las muestras en un periodo de dieciocho meses, lo que ha facilitado su estudio homogéneo. El predominio de mujeres sobre varones discrepa de la mayor prevalencia descrita de esta enfermedad en varones (Catovsky y Foa, 1990), si bien es cierto que no son pacientes diagnosticados de forma consecutiva. La edad de los pacientes osciló entre los 46 y 82 años (65 ± 9) y ninguno tenía en el momento del diagnóstico menos de 40 años, lo que apoya la rareza de esta entidad en décadas tempranas de la vida (Gale y Foon, 1987; Montserrat y col., 1991; Batata y Shen, 1992).

Los pacientes se distribuyeron según los estadios de la clasificación de Rai y Binet. Ambos sistemas de estadiaje han demostrado la correlación entre los

distintos estadios en ellas propuestos y las curvas de supervivencia de la LLC (Rai y col., 1975; Binet y col., 1981). Veintidós pacientes se encontraban en el estadio 0 de Rai, cinco en el estadio I, nueve en el estadio II, uno en el estadio III y dos en el estadio IV. Por lo tanto, veintidós pacientes pertenecían al grupo de riesgo bajo (estadio 0), catorce al grupo de riesgo intermedio (estadios I y II), y tres al grupo de riesgo alto (estadios III y IV). Por lo que hace referencia a la clasificación de Binet, treinta y uno de los pacientes estaban incluidos en el estadio A, cinco en el estadio B y tres en el estadio C. La distribución de los enfermos por estadios viene condicionada porque en el estudio sólo se incluyeron pacientes que no habían recibido previamente ningún tipo de tratamiento específico para la LLC-B. De ahí, el alto porcentaje de enfermos en los grupos de riesgo bajo e intermedio según la clasificación de Rai, y en el grupo A de la clasificación de Binet.

Sólo un paciente presentó fenómenos de autoinmunidad, que consistieron en la positividad de la prueba de Coombs directo, en ausencia de anemia, trombocitopenia o neutropenia autoinmune. En términos relativos, supone una cifra de un 3% de los pacientes incluidos en la serie. Este valor es discretamente inferior a lo publicado (Catovsky y Foa, 1990), aunque, como ya se ha reflejado anteriormente, los enfermos de este estudio se han recogido de forma no aleatoria, no incluyendo pacientes tratados previamente o que estaban recibiendo tratamiento específico para su LLC-B en ese momento. Ningún paciente presentaba paraproteinemia monoclonal.

Estudio inmunofenotípico de las células mononucleadas de sangre periférica y de los linfocitos B purificados

Se analizaron las poblaciones de linfocitos T, células "natural killer", monocitos y de linfocitos B en las CMSP mediante citometría de flujo.

Sólo en uno de los veintiséis pacientes en los que se estudió la expresión de los antígenos de superficie de membrana CD4 y CD8, se objetivó inversión del cociente linfocitario CD4/CD8. Esto contrasta con publicaciones previas, en las que aparece con mayor frecuencia una inversión de este cociente, que es atribuido a una expansión de la población linfocitaria supresora CD3 (+) CD8 (+) (Lauria y col., 1974; Laguna, 1983; Markey y col., 1986; Gale y Foon, 1987). No se observaron en el análisis células que expresaran simultáneamente los antígenos CD4 y CD8 -típico

de los timocitos y no de los linfocitos T maduros-, a diferencia también de los resultados de otras series. Como ya se describió en la Introducción, los datos hasta ahora conocidos y publicados sobre este campo son poco claros y en su mayoría contradictorios (Freedman, 1990; Dighiero, 1993).

El número relativo de células NK entre las CMSP analizadas, no estaba aumentado; sólo dos de los treinta y tres pacientes en los que se ha efectuado el análisis, tenían un porcentaje de células NK igual o superior al 10% (10% y 20% respectivamente). No se realizó un estudio de la actividad funcional de estas células, que se ha demostrado que está disminuida en la LLC-B (Foa y col., 1986; Álvarez-Mon y col., 1986; Álvarez-Mon y col., 1987).

El porcentaje de monocitos en la población analizada estaba disminuido en la mayoría de los casos (el 85% de las muestras tenían una cifra igual o inferior al 5%), como es de esperar en la LLC-B por la expansión de la población neoplásica.

Los linfocitos B de todos los pacientes analizados expresaban, de forma única, la cadena ligera de la inmunoglobulina kappa (70% de los casos) o lambda, lo que apoya el origen clonal de este proceso linfoproliferativo (Brouet y Seligmann, 1977; Solanki y col., 1982). La intensidad de fluorescencia para ambos antígenos fue inferior a la del antígeno de superficie de membrana Pan B, CD19, de acuerdo con lo ya conocido de que la intensidad de expresión de la inmunoglobulina de superficie en el linfocito B leucémico es mucho más débil que en el linfocito B normal (Brouet y Seligmann, 1977).

Todos los linfocitos B de cada muestra de CMSP analizada expresaban en su membrana de superficie los antígenos CD5, CD20, HLA DR, así como el CD19, que definen a la población linfocitaria B. El porcentaje de células que expresaron los cuatro antígenos de membrana señalados fue parecido, teniendo en cuenta que el antígeno CD5 lo expresan los linfocitos T junto a los linfocitos B de la LLC-B, y que el HLA DR es expresado por las células presentadoras de antígeno, como son el linfocito B y los macrófagos. La coexpresión de estos antígenos de membrana apoya el diagnóstico de LLC con fenotipo B y constituyó un punto de partida básico para la recogida e inclusión de los pacientes en este trabajo (Freedman y Nadler, 1987; Freedman, 1990; Catovsky y Foa, 1990; Cheson, 1991). En cuanto hace referencia a la densidad antigénica, reflejada por la medida de la intensidad de fluorescencia, llama la atención la menor densidad del antígeno de superficie de membrana CD20, en comparación con el resto de los antígenos estudiados, lo que coincide con datos de publicaciones recientes (Ginaldi y col., 1994), y que lleva a sugerir que en

los pacientes con LLC-B el CD19 es el antígeno de superficie más fiable para la identificación del fenotipo B de la estirpe celular leucémica, antes que el propio CD20. Se observó también variabilidad entre las distintas muestras de células leucémica en relación a la densidad antigénica de los antígenos citados.

En ninguna de las muestras estudiadas se observó que las células B leucémicas expresaran en su membrana antígenos de la línea mielomonocítica (CD14), lo que apoya la rareza de este hallazgo (Polliack y col, 1992; Temperton y col., 1993), en contra de la información recogida en otras revisiones de la enfermedad (Dighiero, 1992; Montserrat, 1992; O'Brien y col., 1995).

En las muestras en que se analizó la presencia de receptores para los hematíes de ratón, se comprobó su validez como marcador diagnóstico de la LLC-B, coincidiendo así con opiniones vertidas con anterioridad (Laguna, 1983; Batata y Shen, 1992; Hokland y col., 1992). Sin embargo, la técnica es laboriosa y subjetiva si se compara con el estudio fenotípico de la población celular mediante citometría de flujo, y no ha sido necesaria para establecer el diagnóstico de LLC-B en los pacientes incluidos en esta serie.

A las CMSP obtenidas (Bøyum, 1968) se les sometió a un proceso de eliminación de los linfocitos T, mediante la realización de una selección negativa con hematíes de carnero tratados con AET, con el fin de obtener la población de linfocitos B purificada (Jondal y col., 1972; Kaplan y col., 1976; Madsen y col., 1980). Con este procedimiento se consiguió que en treinta de las treinta y nueve muestras obtenidas (77%) el porcentaje de linfocitos T, monocitos y células NK fuera inferior al 5%. El porcentaje del 95% de células B leucémicas purificadas es el empleado con más frecuencia por los distintos grupos de trabajo (Biondi y col., 1989; Lahat y col, 1991). No se utilizó ninguna técnica de separación de los monocitos ni de las células NK.

Análisis de la expresión del receptor de la IL-2 en la superficie del linfocito B de la LLC

El receptor de la IL-2 es un complejo molecular compuesto por tres cadenas polipeptídicas diferentes $-\alpha$, β , γ , que tienen propiedades funcionales diversas. Este receptor es de alta afinidad cuando existe una interacción estrecha entre sus

cadena α y β (Burton y Kay, 1994). En este trabajo no se ha analizado si los receptores para la IL-2 que existen en los linfocitos neoplásicos de la LLC-B son de alta afinidad, por no haberse examinado la presencia de su cadena β .

Las células de la LLC-B expresan en su membrana, de forma constitutiva, el CD25 (cadena α del R-IL2) en un porcentaje variable. En este estudio, el 24% de los pacientes en los que se analizó la expresión de este antígeno, no presentaban en su superficie de membrana el CD25 (expresión inferior o igual al 15%), mientras que el 76% de los pacientes estudiados sí lo expresaron. Estos resultados están en consonancia con los publicados por distintos grupos en los últimos años (Aguilar-Santelises y col., 1993; Tsilivakos y col., 1994; Nakase y col., 1994; Burton y Kay, 1994), discrepando de la información aportada previamente (Touw y col., 1987).

Las muestras que expresaron el CD25 en sus linfocitos B, lo hicieron en todas sus células. Este hallazgo contradice lo sugerido por otros estudios (Tsilivakos y col., 1994), según los cuales, dentro del mismo paciente, unas células expresarían dicho antígeno de superficie y otras no, lo que indicaría la existencia de una heterogeneidad fenotípica intraclónica. Esta aparente divergencia puede explicarse por la baja densidad de este antígeno de activación celular en los linfocitos B leucémicos, medido de forma indirecta por la intensidad de fluorescencia en la citometría de flujo. Tanto la media como la mediana de fluorescencia para la expresión del R-IL2 en los linfocitos B de la LLC-B, fueron muy inferiores a las obtenidas para los antígenos de superficie CD19, CD5, HLA DR e incluso CD20. Sin embargo, fue similar a la del R-IL6 como se describe más adelante. Esta baja densidad antigénica puede llevar a una interpretación errónea de los resultados, si se emplea un método incorrecto de análisis. Por eso, en este estudio se ha empleado un procedimiento matemático de sustracción de histogramas, aportado por el programa Lysys II, más exacto que el análisis convencional (cálculo de poblaciones celulares positivas y negativas mediante la colocación de cursores).

Sin embargo, a pesar de que el método utilizado se acerca bastante a la realidad, no se puede descartar que los pacientes en los que no se observó expresión de este antígeno de superficie, no lo expresaran realmente. Esto es debido, como ya se ha explicado, a que la detección correcta del CD25 mediante citometría de flujo, está limitada por su baja densidad antigénica, es decir, por la presencia de un número bajo de estas proteínas. Existen técnicas más sensibles (ensayo de unión al R-IL2 de la IL-2 marcada con el isótopo ^3H) que llevan a resultados más seguros y que deben ser empleadas en casos de aparente

negatividad antigénica no esperada (Muraguchi y col., 1985; Yagura y col., 1990; Burton y Kay, 1994).

El R-IL2 lo expresan, entre otros grupos celulares, los linfocitos B activados o estimulados (Burton y Kay, 1994). En este sentido, el 76% de los pacientes con LLC-B de esta serie en los que se ha visto la expresión del antígeno celular CD25, podrían ser consideradas como células activadas. Sin embargo, se sabe que el antígeno CD25 no es un epítipo funcional para la IL-2, por lo que la sola presencia de la cadena α del R-IL2 en las células no es suficiente para que la IL-2 induzca en ellas una respuesta mitogénica.

Acción de la IL-2 recombinante y el PDB sobre la proliferación celular

Se estudió la respuesta proliferativa de los linfocitos B leucémicos, en cultivo de tres y siete días y a diferentes concentraciones (100.000 y 500.000 células/pocillo), frente a la IL-2 exógena aislada y en combinación con el PDB. Del mismo modo que se encontró variabilidad entre los pacientes en lo que hace referencia a la expresión de la cadena α del R-IL2, también la hubo al analizar el efecto de la IL-2 sobre la proliferación celular. Este hallazgo puede ser reflejo de la heterogeneidad funcional de los linfocitos B de la LLC-B (Karray y col., 1987).

La IL-2, empleada tanto de forma aislada como en asociación con el éster del forbol, en los experimentos con duración de tres y de siete días y a la concentración de 100.000 células/pocillo, no indujo la proliferación de los linfocitos B leucémicos. Por lo que hace referencia al experimento diseñado con la concentración de 500.000 células/pocillo y con una duración de siete días, la IL-2 utilizada de manera aislada a la dosis de 100 U/ml, y en combinación con el PDB a 10 U/ml, tuvo un efecto positivo sobre la proliferación celular leucémica ($p < 0.05$). La falta de respuesta de los linfocitos B leucémicos a la IL-2, observada en todos los casos excepto en los últimos mencionados, podría ser explicada por anomalías constitucionales o funcionales del R-IL2 (internalización, fosforilización), o a la altura del segundo mensajero.

La observación de que los índices de proliferación fueran superiores en los experimentos diseñados con una duración de siete días y una concentración celular

de 500.000 células/pocillo que en los de tres días, no difiere de otras aportaciones (Karray y col., 1987; Yagura y col., 1990; Burke y col., 1993). No se ha investigado el por qué de este hallazgo, aunque podría estar en relación con la muerte celular programada que sufren los linfocitos B de la LLC-B cuando se mantienen en cultivo (Collins y col., 1989), posiblemente en una proporción mayor que la experimentada por la población de células T presentes en ese mismo cultivo, que proliferarían en respuesta a la IL-2.

Se analizó si la expresión del CD25 por las células B leucémicas se relacionaba con la respuesta proliferativa a la IL-2, resultando que la expresión del R-IL2 se asociaba a una proliferación celular superior a la obtenida cuando las muestras de linfocitos B purificados no expresaban dicho receptor ($p < 0.05$), aunque sólo cuando se empleó la IL-2 de forma aislada en los cultivos de siete días, con una concentración de 500.000 células/pocillo. Esta conclusión, extraída del análisis del conjunto de los pacientes, no obvia el que de forma individualizada existieran enfermos que aunque no expresaran de forma constitutiva el receptor de la IL-2 proliferaran en presencia de la IL-2 recombinante y viceversa, datos que confirman otros de reciente publicación (Tsilivakos y col., 1994). El valor de este hallazgo, relativo al antígeno CD25 puede ser válido también para los receptores de alta afinidad de la IL-2, pues se ha demostrado que los linfocitos B de la LLC-B presentan receptores de alta afinidad para la IL-2 independientemente de su respuesta mitogénica a la citocina (Yagura y col., 1990).

En resumen, los resultados de este trabajo parecen indicar que existe una correlación entre la presencia de la cadena α del R-IL2 y la proliferación celular frente a la IL-2. Además, se supone que este elevado porcentaje de expresión del receptor de la IL-2 en los linfocitos B leucémicos en la LLC-B juega un papel en la disfunción del sistema de células T y NK, a través de la capacidad potencial de sus receptores solubles de ligar la IL-2 circulante (Kay y col., 1988). En cualquier caso, la conjunción de todos los datos y de otros ya existentes en la literatura (Burton y Kay, 1994), sugieren que la IL-2 no es de forma consistente un factor de crecimiento *in vitro* para esta neoplasia hematológica.

Por otro lado, el PDB no estimuló, cuando se empleó de forma aislada, la proliferación celular leucémica en ninguno de los tres tipos de experimentos diseñados, aunque de forma individual sí hubo pacientes cuyas células B respondieron a la acción de dicho mitógeno. Este hallazgo está también en consonancia con los de otros grupos, que objetivan una heterogeneidad en la respuesta de los linfocitos B de la LLC-B al éster del forbol (Okamura y col., 1982).

Acción de la IL-2 recombinante y el PDB sobre la diferenciación celular

El análisis funcional del R-IL2 se completó con el estudio de la acción de la citocina sobre la diferenciación celular leucémica. La producción de inmunoglobulinas por la célula plasmática representa el estadio final de la maduración del linfocito B y la culminación de su función. La IL-2 exógena -empleada de forma aislada y a la dosis de 100 U/ml-, no indujo la producción de inmunoglobulina A ni G por parte del linfocito B leucémico, al contrario de lo que ocurrió con la inmunoglobulina de clase M, que aumentó ($p < 0.05$), aunque de forma heterogénea, cuando se añadió al medio de cultivo la IL-2 a la dosis mencionada. Sin embargo, no se objetivó que la IL-2 indujera cambios en el fenotipo de las células B leucémicas tras siete días de cultivo, hecho que podría ser debido al escaso número de células que habrían experimentado diferenciación en presencia de la IL-2 exógena.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con los publicados por otros grupos de trabajo (Poljak y col., 1993). Es un hecho conocido que existe una secreción espontánea de IgM por parte de los linfocitos B de la LLC-B y que el estímulo en la producción de dicha inmunoglobulina por la IL-2 se produce de forma heterogénea en estos enfermos. Además, y a diferencia de lo que se observa en personas sanas, la adición al medio de cultivo de esta interleucina no induce la producción de IgG, y la secreción de IgM por parte de los linfocitos B de la LLC-B es inferior a la detectada en el grupo de individuos sanos (Poljak y col., 1993). Estas observaciones hablarían también a favor de un diferente grado de incapacidad funcional de las células B leucémicas.

De igual forma a lo observado para la IL-2, el éster del forbol empleado (PDB) indujo la producción de IgM ($p < 0.05$) pero no de IgA ni de IgG. Tampoco se evidenció cambio en el fenotipo de las células leucémicas tras siete días de cultivo en presencia de PDB. En el caso de ambos mitógenos (IL-2 y PDB) no se analizó si la inmunoglobulina detectada era monoclonal. Este estudio ha sido ya realizado por otros autores, que han demostrado la monoclonalidad de las inmunoglobulinas secretadas por las células leucémicas de la LLC-B en cultivo (detección de la cadena ligera lambda o kappa de dicha Ig), haciendo notar además que la producción de la Ig monoclonal por las células leucémicas puede venir oculta por la producción de

otras Ig por una pequeña proporción de células B no neoplásicas presentes en los cultivos (Poljak y col., 1993; Van Kooten y col., 1993_a). Como ya se ha mencionado, ninguna de las muestras incluidas en el estudio procedía de pacientes con paraproteinemia monoclonal.

Se ha demostrado que el éster del forbol "12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate", induce la aparición de un 90 a un 100% de células de aspecto linfoblastoide y plasmocitoide después de cuatro días de cultivo de las células B de la LLC-B. Además, bajo su influencia, alrededor del 50% al 90% de las células leucémicas de la LLC-B expresan con el tiempo cantidades crecientes de inmunoglobulina intracitoplasmática, observándose al mismo tiempo una disminución en la densidad de la inmunoglobulina de superficie monoclonal y de la síntesis de ADN (Tötterman y col, 1980; Okamura y col., 1982). De igual forma, el "12-mirystate-phorbol-13-acetate" induce la diferenciación celular en la LLC-B (Van Kooten y col., 1993_a). Además, hay autores que comentan que la capacidad que tienen las células B leucémicas de diferenciarse en respuesta a las señales vía segundo mensajero está intacta (Drexler y col, 1987).

Pudiera ocurrir que existieran estadios diversos de parada en el proceso de diferenciación dentro del mismo clon expandido de células B de la LLC-B. El clon de linfocitos B CD5 (+) podría ser una población acumulada de células B detenidas en varios estadios madurativos a lo largo de su camino de diferenciación, debido a factores insuficientes implicados en dicho proceso, más que representar una neoplasia típica.

Análisis de la expresión del receptor de la IL-6 en la superficie del linfocito B de la LLC-B

En las veintiocho muestras incluidas en el análisis se observó la expresión constitutiva del receptor de la IL-6 en la membrana de superficie en el $91.2\% \pm 4.9$ de los linfocitos B leucémicos (85% - 100%), cuando se llevó a cabo la técnica de inmunofluorescencia directa, con la propia citocina usada como ligando en unión a la ficoeritrina. La intensidad de fluorescencia de este antígeno de superficie fue inferior al obtenido con los antígenos que definen la población leucémica (CD19, CD5, HLA DR e incluso el CD20), pero similar al CD25. Esto es signo indirecto de la baja densidad de este antígeno en la superficie del linfocito B. El resultado

obtenido mediante el programa de análisis "Paint a gate" del citómetro de flujo fue superponible (al igual que se objetivó con el estudio del antígeno CD25) al del programa "Lysys II", utilizando al mismo tiempo la operación aritmética de la sustracción de histogramas facilitada por dicho programa.

La no comprobación de la unión específica de la IL-6 al receptor de dicha citocina en la membrana del linfocito B leucémico mediante la preincubación de dichas células con un exceso de IL-6, se suplió con el desarrollo de una técnica indirecta de inmunofluorescencia y la utilización de un anticuerpo específico frente a dicho antígeno de membrana. Cuando se analizaron los resultados obtenidos con este método, se observó una menor expresión del R-IL6 por los linfocitos B de las muestras purificadas de LLC-B ($52.5\% \pm 16.7$; rango: 20% - 85%) respecto a los resultados obtenidos con la técnica de inmunofluorescencia directa. Este hallazgo confirma los de otras publicaciones que demuestran que el empleo del anticuerpo específico frente al antígeno (R-IL6) constituye una técnica menos sensible que la que utiliza el propio ligando (Aguilar-Santelises y col., 1993).

La interleucina 6 realiza su acción a través de un receptor de membrana y debido al pleiotropismo de esta interleucina, se pueden encontrar receptores de esta interleucina en varias líneas celulares (Taga y Kishimoto, 1992_a). En relación a la estirpe celular B, el R-IL6 no se expresa en linfocitos B no activados y sí en linfocitos B activados (Taga y Kishimoto, 1992_a). Según esta aseveración, repetidamente contrastada (Taga y col., 1987; Conlie P, 1989; Munck-Petersen C, 1990; Gearing D. P., 1992; Wognum y col., 1993), los datos obtenidos en esta serie de pacientes de LLC-B indicarían que los linfocitos de estos enfermos muestran características de células activadas. Esta observación se une al hallazgo de la expresión del receptor de la IL-2 en estas mismas células. La presencia de células activadas, como se deduce de la detección de los antígenos de activación CD25 y R-IL6, no implica que se produzca de forma consecutiva la proliferación celular (Engel y col., 1989).

La observación de que los linfocitos B leucémicos expresan el R-IL6, como indicador de activación celular (Taga y Kishimoto, 1992_a), está en consonancia con otras publicaciones sobre antígenos de membrana o propiedades de estas células, que llevan a sugerir que realmente son células activadas de forma basal. En este sentido, también se conoce la capacidad de los linfocitos B de la LLC-B de producir TNF α (Morabito y col., 1993) e IL-8 (Di Celle y col., 1994) en ausencia de mitógenos, y la presencia en estas células de receptores de alta afinidad para el TNF α (Nilsson y col., 1992; Waage y col., 1992; Trentin y col., 1993; Trentin y col., 1994) y el IFN γ

(Dadmarz y Cawley, 1988) de forma constitutiva. Sin embargo, no todas las muestras de los pacientes que expresaron el receptor de membrana de la IL-6 presentaron la cadena alfa del R-IL2, siendo ambos como son antígenos de activación, aunque hay que tener en cuenta las limitaciones del estudio citométrico ya comentadas.

La demostración de la expresión constitutiva del receptor de la IL-6 en los linfocitos B leucémicos contradice los hallazgos negativos en este campo publicados previamente (Perri, 1986; Nilsson y col., 1992; Aguilar-Santelises y col., 1993), pero confirma el resultado obtenido por otros grupos de trabajo, que objetivan la expresión del receptor de esta citocina aunque de forma poco intensa (Lavabre-Bertrand y col., 1992), o bien demuestran la expresión del ARNm del receptor de la IL-6 en los pacientes con LLC-B (Plate y col., 1993_b).

El análisis de la expresión del R-IL6 en los pacientes distribuidos según el sistema de estadiaje de Rai, demostró que aquellas muestras de enfermos incluidos en el grupo de riesgo bajo (estadio 0) expresaban el receptor de membrana de la IL-6 en un porcentaje mayor que las pertenecientes al grupo de riesgo intermedio (estadios I y II) ($p < 0.05$). El significado de este hallazgo, no descrito previamente, se discute más adelante.

Una vez conocida la presencia del receptor de la IL-6 en la membrana de superficie del linfocito B de la LLC-B, se planteó la acción ejercida por la IL-6 sobre esas células, es decir, sobre la inducción o regulación de la proliferación y diferenciación de las células B leucémicas, y su relación con el desarrollo de fenómenos autoinmunes.

Efecto de la IL-6 exógena, y de un anticuerpo específico frente a la IL-6 sobre la proliferación celular en la LLC-B

La IL-6 no estimula ni inhibe la proliferación de las células B normales, a diferencia de su acción positiva sobre los linfocitos T (Taga y Kishimoto, 1992_a).

En este estudio se analizó la acción desarrollada por la IL-6 recombinante, con un rango de dosis comprendido entre 20 ng/ml y 0.625 pg/ml, sobre las células B de la LLC-B en cultivo de tres y siete días de duración y a una

concentración de 100.000 y 500.000 células/pocillo. La IL-6, al emplearla de forma aislada en las distintas condiciones de cultivo, no indujo la proliferación de los linfocitos B de la LLC-B en ningún caso. Además, para las dieciséis dosis de IL-6 empleadas, los índices de proliferación fueron inferiores a 1.03 en los tres tipos de experimentos realizados.

Se observó una inhibición de la proliferación inferior al 50% (es decir, con índices de proliferación comprendidos entre 0.50 y 1.00) cuando se realizó el experimento con una duración de tres y siete días con una concentración de 100.000 células/pocillo. Por el contrario, cuando se llevaron a cabo los cultivos durante siete días con una concentración celular de 500.000 células/pocillo, se produjo una inhibición de la proliferación celular superior al 50% (índices de proliferación inferior a 0.50) al emplear las cuatro dosis más altas de IL-6 exógena (20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml y 2.5 ng/ml) e inferior al 50% en el resto de las dosis ($p < 0.05$).

La ausencia de proliferación celular producida con la IL-6 se objetivó también al analizar los resultados obtenidos al estudiar la morfología de los ciclos celulares de células B leucémicas en cultivo con dicha citocina. La fase G₂/M y S en conjunto no superaban el 5.5% de las células viables en los seis pacientes analizados, tanto con la dosis de IL-6 de 20 ng/ml como con la de 10 y 1 ng/ml, y tanto a los tres como a los siete días de cultivo.

Por lo tanto, la IL-6 se comporta de forma semejante a como lo hace en linfocitos B de personas sanas, ya que no induce la proliferación celular. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en las células B normales, los linfocitos B de la LLC-B responden a la IL-6 inhibiendo su proliferación, en un porcentaje superior al 50% cuando se utilizan las dosis de citocina exógena ya mencionadas. Este hallazgo está de acuerdo con el encontrado, aunque de forma más limitada, por Aderka y col., 1993, e iría en contra de otras publicaciones, en las cuales no se observó ningún efecto de la IL-6 sobre la proliferación celular leucémica (Caligaris-Cappio y col., 1989; Carlsson y col., 1989; Digel y col., 1991; Van Kooten y col., 1992; Jewell y col., 1993).

Al utilizar la IL-6 recombinante en combinación con el PDB no se objetivó un efecto nítido sobre la proliferación, pues los índices no fueron inferiores a 0.50, ni superiores a 2.00 en ninguno de los experimentos analizados. Sí se observó que con el uso de ambos mitógenos se conseguían índices de proliferación superiores que con el empleo de la IL-6 aislada, diferencia significativa ($p < 0.05$) con alguna

de las dosis utilizadas: 2.5 ng/ml y a partir de la dosis de 312 pg/ml hasta la última de 0.625 pg/ml (cultivo de tres días); 5 ng/ml (cultivo de siete días a una concentración de 100.000 células/pocillo); 2.5 ng/ml, 312 pg/ml, 156 pg/ml y 0.625 pg/ml (cultivo de siete días a una concentración de 500.000 células/pocillo). Por lo tanto, el éster del forbol añadido al cultivo contrarrestaría parcialmente el efecto inhibitor de la IL-6 sobre la proliferación celular leucémica.

La combinación de la IL-6 y del activador policlonal de linfocitos B SAC₂, tampoco estimuló ni inhibió la proliferación celular, salvo cuando se emplearon ambos en asociación con el éster del forbol. Entonces, y con las dosis de 625 pg/ml (n.s.), 156 pg/ml (n.s.), 39 pg/ml (n.s.) y 0.625 pg/ml ($p < 0.05$), se objetivó estímulo de la proliferación de los linfocitos B leucémicos. No hubo diferencia significativa cuando se empleó la IL-6 de forma aislada o en combinación con el SAC₂, por lo que en este trabajo el SAC₂ no demostró actividad sobre la proliferación celular leucémica cuando se añadió al medio de cultivo al mismo tiempo que la IL-6, resultado en concordancia con lo ya publicado (Laguna, 1983). Esta es pues una diferencia esencial de comportamiento del SAC₂ con relación a los linfocitos B de personas sanas, sobre los cuales ejerce una acción mitogénica positiva (Romagnani y col., 1978).

La inhibición del crecimiento de los linfocitos B leucémicos de la LLC-B por la IL-6 llama la atención, puesto que dicha citocina está considerada como un factor estimulador del crecimiento para las neoplasias de células B, como el mieloma múltiple y algunos linfomas (Kawano y col., 1988; Bataille y col., 1989; Kishimoto, 1989; Zhang y col., 1989; Kyle, 1994; DuVillard y col., 1995). Sin embargo, la IL-6 no tiene siempre un efecto estimulador de la proliferación celular, sino que también se ha demostrado que esta citocina actúa como un factor con capacidad de inhibir el crecimiento e inducir la diferenciación de células leucémicas de estirpe mieloide y de inhibir la proliferación de células del carcinoma de mama (Hirano, 1992; Akira y col., 1993).

Las células B de la LLC-B proliferan de forma espontánea cuando se cultivan en medio desprovisto de mitógenos (Moore y col., 1993; Fluckiger y col., 1994; Lagneaux y col., 1994). Con la finalidad de comprobar si la posible IL-6, producida y secretada por los linfocitos B leucémicos, intervenía de algún modo sobre esta respuesta proliferativa, se realizaron experimentos en los que se añadió al medio de cultivo un anticuerpo específico frente a la IL-6 (Anti-IL6) en diferentes dosis (en un rango comprendido entre 25 µg/ml y 0.5 ng/ml). La proliferación espontánea detectada en los cultivos de linfocitos B leucémicos purificados

aumentó al añadir al medio de cultivo dicho anticuerpo en todas las dosis utilizadas, tanto si se adicionaba de forma aislada como si se asociaba con el PDB. Además, esta respuesta se producía cuando el experimento tenía una duración de tres (100.000 células por pocillo) y de siete días (500.000 células por pocillo), siendo más significativo en el segundo de ellos y cuando las dosis de Anti-IL6 utilizadas eran cercanas a 25 µg/ml (rango comprendido entre 25 µg/ml y 750 ng/ml; $p < 0.05$).

Este hallazgo lleva a pensar que la IL-6 producida de forma endógena y secretada al medio, inhibiría la incorporación de timidina tritiada por las células B en cultivo, es decir, inhibiría la síntesis *de novo* de ADN, y que esta inhibición sería una acción específica de esta citocina puesto que revertía al añadir al medio un anticuerpo monoclonal frente a la IL-6.

Sin embargo, los datos objetivados en publicaciones previas sugieren que en la proliferación espontánea de los linfocitos B de la LLC-B, intervienen otros factores además de la IL-6 endógena. Así, se ha visto que la IL-4 inhibe la proliferación celular inducida por TNF α , y que esta respuesta revierte de forma específica mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal frente a la IL-4 (Van Kooten y col., 1993_b). Este mismo grupo de trabajo demuestra que la inhibición por la IL-6 del estímulo proliferativo del TNF α revierte, también específicamente, con la adición al medio un anticuerpo frente la IL-6 en una dosis de 10 µg/ml. Además, objetivan que la inhibición producida por la IL-6 sobre la proliferación celular leucémica es dosis dependiente, con un efecto máximo de 400 pg/ml (Van Kooten y col., 1993_b). Esta relación dosis/respuesta proliferativa no ha sido encontrada en nuestro estudio con el empleo de la IL-6, tanto de forma aislada como en combinación con el PDB, y tampoco con el empleo del Anti-IL6 en las mismas circunstancias, excepto con el rango de dosis comprendidas entre 25 µg/ml y 750 ng/ml con respecto al resto de las dosis de ese anticuerpo adicionadas ($p < 0.05$).

Efecto de la IL-6 exógena sobre la diferenciación celular

La acción de la IL-6 sobre las células B de personas sanas estimuladas con SAC es la de inducir la producción de inmunoglobulinas, es decir, la inducción de su diferenciación (Taga y Kishimoto, 1992_a).

A diferencia de la acción de la IL-6 sobre las células B normales, esta citocina no induce la diferenciación de los linfocitos B de la LLC-B, como se deduce de los experimentos realizados, si bien las células leucémicas no fueron activadas previamente con SAC₂. No se observó producción de IgA ni de IgG, y la producción de IgM con las diferentes dosis de IL-6 exógena utilizadas fue muy discreta (n.s.). Además, no se observó cambio en el fenotipo de los linfocitos B cultivados durante siete días en presencia de esa citocina. Este hallazgo está de acuerdo con las observaciones realizadas por otros autores (Caligaris-Cappio y col., 1989; Carlsson y col., 1989; Fluckiger y col., 1992; Nilsson y col., 1992; Aderka y col., 1993; Van Kooten y col., 1993_b).

La IL-6 realiza su acción a través de un receptor de membrana. Todos los pacientes de esta serie, en los que se ha estudiado la expresión del R-IL6 en el linfocito B de la LLC-B, lo presentan en su membrana. Sin embargo, y a pesar de ello, la IL-6 no realiza la acción esperada sobre estas células, es decir, no induce la producción de inmunoglobulinas -como ocurre en los linfocitos B normales activados-, ni estimula la proliferación celular leucémica con ninguna de las dosis de IL-6 recombinante empleadas -como sí ocurre en las células de determinadas líneas de mieloma múltiple (Kawano y col., 1988)-. De manera semejante a cuando se ha descrito la presencia del antígeno CD25 en la población celular leucémica, nos encontramos con que la expresión del R-IL6 en la membrana de superficie de dichas células no va seguida de una acción propia de la IL-6, si exceptuamos los casos ya mencionados de inhibición de la proliferación celular. Quizás el fallo pueda estar nuevamente en un defecto estructural o funcional del receptor de la IL-6, o bien a la altura del segundo mensajero, o ser consecuencia de las características de la subpoblación de células B leucémicas.

Por lo que hace referencia al empleo de forma conjunta de la IL-6 (en las dieciséis dosis utilizadas) y del éster del forbol, se objetivó una producción de inmunoglobulina de la clase M ($p < 0.05$) sin diferencias significativas entre las diferentes dosis de IL-6 adicionada, de donde se extrae la conclusión de que fue nuevamente el estímulo del PDB el que hizo que las células B leucémicas produjeran IgM. La asociación de ambos mitógenos no consiguió la producción de IgA ni de IgG, como ya se había observado al emplear el PDB de forma aislada. Tampoco en estos experimentos se comprobó que la inmunoglobulina producida y secretada por las células B leucémicas fuera monoclonal, como sí confirman otros grupos de trabajo (Poljak y col., 1993).

Estudio de la presencia en el suero de los pacientes de la IL-6 y del receptor soluble de la IL-6

Los niveles séricos de IL-6 en todas las muestras analizadas estuvieron por debajo del límite inferior de detección de la técnica de ELISA empleada (< 0.70 pg/ml). Este resultado coincide con los obtenidos por otros grupos, que tampoco encontraron niveles séricos elevados de la citocina (Aguilar-Santelises y col., 1992; Aguilar-Santelises y col., 1993; Carrión y col., 1995), o que comprueban que no existe diferencia en la IL-6 sérica detectada entre personas sanas y enfermos con LLC-B (Pettersson y col., 1992).

Sin embargo, Aderka y col., 1993, encontraron niveles séricos de IL-6 detectables, que disminuían en relación inversa a los estadios de la clasificación de Rai, lo que sugiere que los estadios avanzados de la LLC-B pueden ir asociados con una producción menor de IL-6, dato que sería compatible con el papel inhibitorio de esta citocina en la LLC-B. Si se analizan con detenimiento los resultados publicados por este grupo de trabajo, se observa que detectan la IL-6 en el 39% de las muestras de suero de las personas sanas analizadas, y que además, la presencia de esa citocina en el suero de los pacientes con LLC-B se observa en el 54% de las muestras en estadio 0, disminuyendo progresivamente hasta el 20% en los enfermos en estadio IV de la clasificación de Rai. Por otra parte, no se describe en dicha publicación si los valores encontrados diferían entre ambos grupos (pacientes y controles) o si existía diferencia significativa entre los pacientes incluidos en los diferentes estadios de la clasificación de Rai. El no encontrar en nuestra serie resultados positivos impide la valoración sobre la distribución de las muestras de LLC-B según el sistema de estadiaje de Rai.

La no detección de la IL-6 en el suero de los pacientes con LLC-B en esta serie puede deberse a la diferente sensibilidad de la técnica de ELISA empleada, o bien a una población de enfermos distinta. Además, se ha observado que durante el día existen variaciones significativas en los niveles séricos de dicha citocina (Ohtani y col., 1995).

Se detectó la presencia del receptor soluble de la IL-6 en el suero de los pacientes (144.6 ng/ml \pm 20.3; rango: 77-178). A pesar de que esta serie no incluye controles, estos valores fueron en todos los casos superiores a los esperados

para personas sanas (rango: 13.5 - 45.9). Estos hallazgos confirman los de otros autores (Aderka y col., 1993), quienes además comprueban que dichos niveles eran superiores, de forma estadísticamente significativa, a los objetivados en personas sanas.

También se analizó si existía relación entre el grupo de riesgo de los enfermos con LLC-B y la concentración sérica del receptor soluble de la IL-6. Así, los niveles séricos fueron superiores en el grupo de riesgo intermedio (estadios I y II) que en el grupo de riesgo bajo (estadio 0) de la clasificación de Rai, no siendo posible valorar los resultados de los pacientes incluidos en el grupo de riesgo alto (estadios III y IV) por el escaso número de éstos en la serie. Sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos, diferencia que sí se encuentra publicada en otras series entre las muestras correspondientes a los pacientes en los estadios 0, I y II con respecto a los incluidos en el estadio IV de la clasificación de Rai ($p < 0.05$) (Aderka y col., 1993). El incremento del receptor soluble de la IL-6 en estadios avanzados de la LLC-B respecto a los estadios precoces, podría reflejar su liberación aumentada por los linfocitos B leucémicos.

Lo mencionado sobre el receptor soluble de la IL-6 y de la propia citocina en suero, está de acuerdo de forma indirecta, con el hallazgo en este trabajo de que los pacientes de LLC-B en estadio 0 expresaban el receptor de membrana de la IL-6 en mayor proporción que aquellos incluidos en los estadios I y II de la clasificación de Rai ($p < 0.05$). Así, estos resultados indican que los enfermos pertenecientes al grupo de riesgo bajo (estadio 0), tendrían una mayor expresión del receptor de membrana de la IL-6 junto con niveles séricos más bajos del receptor soluble, y una producción mayor de la IL-6 por parte de los linfocitos B leucémicos en este estadio; los hallazgos anteriores se relacionarían con el mayor efecto inhibitorio de la IL-6 en estadios precoces. En nuestra serie no se encontraron diferencias significativas en la acción de inhibición de la IL-6 según la distribución de los pacientes por estadios, aunque la proliferación espontánea fue inferior en las muestras procedentes de los enfermos en el grupo de riesgo bajo que en los de riesgo intermedio (757 ± 452 cpm frente a 1628 ± 1793 cpm) (n.s.), tras siete días en cultivo con una concentración de 500.000 células/pocillo.

Producción y secreción de la IL-6 y del receptor soluble de la IL-6 por las células B de la LLC-B en cultivo

Se analizó la producción de la IL-6 por los linfocitos B leucémicos en los sobrenadantes de las células en cultivo, tras uno, tres, cinco y siete días; en los dos primeros casos, además del cultivo en situación basal, las células se mantuvieron en contacto con un éster de forbol (PDB). Se detectó la presencia de la IL-6 en los sobrenadantes analizados, observándose la producción máxima en el día tres de cultivo en contacto con el PDB (174.3 ± 172.0 ; rango: 0.7 - 625 pg/ml), que disminuyó progresivamente en el día cinco y siete por debajo de la cifra detectada tras 24 horas de cultivo en situación basal. Estos resultados contradicen los publicados en 1987 por Uggla y col., que no objetivan producción de IL-6 por parte de los linfocitos B leucémicos, pero están de acuerdo con los hallazgos comunicados recientemente (Biondi y col., 1989; Burke y col., 1993; Reittie y Hoffbrand, 1994; Carrión y col., 1995). La observación de que estas células B producen IL-6 en presencia de un éster del forbol está en contradicción con lo publicado por otro grupo de trabajo, que demuestra que la secreción de IL-6 es inhibida por activadores de la proteína quinasa C (Carrión y col., 1995).

De nuevo se analizó si existía relación entre el grupo de riesgo de los enfermos con la LLC-B y la cantidad de IL-6 producida por las células B leucémicas. En todos los pacientes se detectó la presencia de la IL-6 en los sobrenadantes de los cultivos. Sin embargo, las diferencias observadas entre los estadios de la clasificación de Rai no fueron en ningún caso significativas (n.s.). Aguilar-Santelises y col., 1993, objetivan mayor producción de IL-6 por las células de los pacientes en el estadio 0 de la clasificación de Rai.

Lahat y col., 1991, observaron que existía relación entre la producción de IL-6 por parte de los linfocitos B leucémicos y el desarrollo de fenómenos de autoinmunidad (anemia hemolítica con prueba de Coombs directo positiva) por parte de los pacientes con LLC-B. De este trabajo no se pudieron extraer conclusiones en torno a esta afirmación, puesto que de los treinta y nueve pacientes de la serie, sólo uno presentó fenómenos autoinmunes (prueba de Coombs directo positiva). En los sobrenadantes de este enfermo se detectó IL-6 en un rango comprendido entre 0.7 pg/ml y 46 pg/ml, inferior a otros muchos pacientes de la serie.

La cantidad de receptor soluble de la IL-6 detectada en los sobrenadantes de las células B en cultivo tras uno, tres, cinco y siete días en cultivo en situación basal fue menor de 3.5 pg/ml (límite inferior de la técnica de ELISA empleada). Este hallazgo podría estar en consonancia con el alto porcentaje de expresión del R-IL6 observada en la membrana de superficie de los linfocitos B de la LLC-B en cultivo en situación basal.

Expresión del R-IL6 y de los antígenos de activación (CD25) y de proliferación (CD71) en las células B en cultivo

El porcentaje de expresión de la cadena alfa del receptor de la IL-2 en los linfocitos B leucémicos no varió a lo largo de los siete días de cultivo, tanto en situación basal (sin contacto con mitógenos) como en presencia del SAC₂. El resultado obtenido fue semejante en el análisis realizado con el programa "Paint a gate" que con el "Lysys II", utilizando la operación matemática de la sustracción de histogramas, (debido a la baja densidad antigénica en la membrana celular). La ventaja que proporciona el primero de los programas mencionados es que permite comprobar la expresión de los tres antígenos estudiados en cada población, definiendo el porcentaje de triple positividad.

La intensidad de fluorescencia del CD25 en los linfocitos B en cultivo en situación basal durante uno, tres, cinco y siete días aumentó en relación al día cero; a su vez, esta intensidad fue superior cuando las células se cultivaron en presencia de SAC₂. Este hallazgo podría indicar que la expresión de este antígeno de activación es mayor tras permanecer los linfocitos B en cultivo con relación al día cero, más aún en contacto con el SAC₂. Sin embargo, las cifras de la intensidad de fluorescencia para los controles isotipo empleados al mismo tiempo, también aumentaron en relación al día cero de cultivo y este incremento fue mayor en presencia del mitógeno SAC₂. Este resultado sugiere que la expresión de la cadena α del receptor de la IL-2 no varía significativamente a lo largo de los días de cultivo, tanto en ausencia como en presencia del SAC₂. Este hallazgo está en consonancia con que las células B de la LLC-B son células basalmente activadas (con expresión de la cadena α del receptor de la IL-2), y que por lo tanto no precisan del activador policlonal de los linfocitos B SAC₂ para conseguir ese estado de activación.

Resultados paralelos se observaron al analizar la expresión del R-IL6, ya presente basalmente en el día cero, en las mismas células leucémicas mantenidas en cultivo durante uno, tres, cinco y siete días, tanto en situación basal como en contacto con el SAC₂. Por las mismas razones que las expuestas con el antígeno CD25, se trataría de linfocitos activados de forma constitutiva, con un efecto nulo del activador SAC₂ sobre los mismos.

Los linfocitos B de las muestras de LLC-B no expresaron el antígeno de proliferación CD71 el día cero, es decir, tras obtención de las CMSP. Tampoco se demostró que aumentara el valor de la intensidad de fluorescencia del CD71 cuando las células permanecieron en el medio de cultivo durante uno, tres, cinco y siete días en ausencia de cualquier mitógeno. Es decir, los linfocitos B leucémicos no expresaron dicho antígeno de proliferación en esas condiciones de cultivo. Este resultado está en consonancia con los demás hallazgos ya comentados: escaso grado de proliferación espontánea de los linfocitos B leucémicos determinada por la incorporación de ³H al ADN sintetizado *de novo* y estudio del ciclo celular con fase G₂/M y S inferior al 5%.

Por el contrario, la intensidad de fluorescencia del CD71 sí aumentó cuando las células B leucémicas se mantuvieron en contacto con el SAC₂ durante los mismos días del experimento, aunque igualmente los resultados fueron acompañados de unas desviaciones típicas muy elevadas y de unos valores de la intensidad de fluorescencia en los controles isotipo también altos. Por tanto, este aumento de la intensidad de fluorescencia del CD71 posiblemente no refleja un aumento de expresión antigénica, ya que los índices de proliferación obtenidos en los experimentos de incorporación de ³H al ADN no demuestran que el SAC₂ tenga un efecto claro sobre la proliferación celular leucémica.

Efecto de la IL-6 sobre la apoptosis de los linfocitos B de la LLC-B

Los valores de los índices de proliferación obtenidos, traducen la incorporación de timidina tritiada al ADN que se sintetiza *de novo*, es decir, el porcentaje de síntesis de ADN en los cultivos de LLC-B. Esto no es sinónimo de división celular, y por tanto de un aumento en el número de células en los cultivos

(Drexler, 1989). Además, la adición de la IL-6 como mitógeno al medio de cultivo puede provocar que la incorporación de timidina tritiada se produzca en una mínima fracción de las células y que no vaya seguida de un incremento significativo en el número celular (Burke y col., 1993). Por otra parte, el resultado final de los índices de proliferación puede venir dado no sólo por el grado de incorporación de la timidina tritiada al ADN sintetizado, o incluso por el aumento del número de células en cultivo, sino también porque el efecto de la citocina estudiada provoque un aumento o bien una disminución de la viabilidad celular, por variación en la supervivencia de las células estudiadas en el cultivo. Es decir, en el caso de los linfocitos B de la LLC-B, el resultado final puede venir dado por la influencia de un mitógeno determinado sobre la apoptosis celular o muerte celular programada. En definitiva, el desarrollo y mantenimiento de una línea celular viene dado por una serie de procesos de regulación que incluyen la proliferación, diferenciación y muerte celular programada.

Un porcentaje importante de linfocitos B de la LLC-B extraídos de la sangre periférica, dejan de expresar la proteína bcl-2 y mueren de forma espontánea cuando se cultivan *in vitro* (Collins y col., 1989). Esta proporción de células es aproximadamente del 20% al 37% después de treinta horas de cultivo en situación basal y alcanza el 90% a 100% tras diez días (Collins y col., 1989; Panayiotidis y col., 1994b). Estas cifras están en discordancia con lo observado con poblaciones de linfocitos T y B de personas sanas, en los que el porcentaje de células muertas por apoptosis en las mismas condiciones y tiempo de cultivo fue del 5%; este hecho sugiere que la apoptosis que tiene lugar en los linfocitos B de la LLC-B en cultivo puede venir desencadenada por la ausencia de uno o varios factores inductores de la supervivencia *in vivo*. Además, incluso en poblaciones celulares que se dividen activamente, la apoptosis no ocurre hasta más allá de 96 horas (Collins y col., 1989). Sin embargo, no todos los pacientes con LLC-B se comportan así, habiéndose observado una vez más una heterogeneidad entre los enfermos en lo referente a la aparición de la apoptosis espontánea (Panayiotidis y col., 1994b). Así, se ha objetivado la existencia de linfocitos B de pacientes con LLC-B resistentes a la apoptosis, cuya supervivencia en cultivo sólo era superior a las cinco semanas, independientemente del estadio de la clasificación de Rai al que pertenecían (Panayiotidis y col., 1994b). Esta heterogeneidad observada podría estar en relación con una variabilidad en la expresión de receptores con afinidad para diferentes factores solubles o citocinas presentes en el medio. La apoptosis es una clase muy selectiva de delección celular, de forma que éstas células se encuentran adyacentes a otras células vecinas no afectadas por ese proceso de muerte celular. No se ha demostrado que la densidad celular en cultivo influya en la muerte celular

programada, y además el análisis más allá de las treinta horas de cultivo es difícil, porque la degeneración secundaria de los cuerpos apoptóticos hace difícil su diferenciación de las células muertas (Collins y col., 1989).

En este proyecto no se ha valorado la acción de las citocinas y mitógenos empleados (IL-2, IL-6, PDB, PHA) sobre la apoptosis de las células B leucémicas. La apoptosis es un proceso de delección celular que tiene lugar en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos. La activación de endonucleasas endógenas es el marcador bioquímico característico de la apoptosis, lo que puede precipitar directamente la muerte celular. La apoptosis comprende gran parte de la muerte celular natural *in vivo*. Esta apreciación lleva a sugerir que la supresión o fallo de algún componente esencial de este proceso podría contribuir a la aparición del cáncer. Según estudios ya publicados, se puede extraer la conclusión general de que los agentes que pueden activar un tipo particular de célula pueden también bloquear la apoptosis de esa misma estirpe celular. En este sentido, aunque siempre de forma heterogénea, la IL-2 y el PDB son mitógenos que inhiben la muerte celular programada de los linfocitos B de la LLC-B (McConkey y col., 1991; Jewell y col., 1993; Huang y col., 1993; Zinzani y col., 1994), mientras que la IL-6 no tendría ese mismo efecto protector (Dancescu y col., 1992; Buschle y col., 1993; Kobayashi y col., 1993; Rojas y col., 1994). En este trabajo de investigación, la IL-6 no inhibió la muerte celular programada en ninguno de los seis pacientes en los que se analizó ese efecto, tanto tras tres como después de siete días de cultivo con dicha citocina a la dosis de 20 ng/ml.

En veintidós de los pacientes en los que se analizó el porcentaje de células no viables (constituidas por la suma de células en apoptosis y de los cuerpos degenerados de apoptosis), se encontraron, ya a las 24 horas del cultivo de células B leucémicas sin contacto con mitógeno un $21.5\% \pm 17.6$ (rango: 1% - 51%) de células no viables, que aumentaban tras 72 horas de cultivo en las mismas condiciones, y que se mantenían también en el día quinto. Estos resultados son similares a los publicados por otros autores (Panayiotidis y col., 1994b). Se ha atribuido una capacidad de provocar la muerte celular programada a los linfocitos T y a las células NK, pero en los cultivos realizados en este trabajo el porcentaje de estas células era inferior al 5%.

Heterogeneidad de la LLC-B

De los resultados obtenidos en este trabajo y ya comentados, se deduce que existe una heterogeneidad entre los pacientes de LLC-B que se demuestra: en la expresión de la cadena α del R-IL2 en la membrana de superficie de los linfocitos B neoplásicos; en el inmunofenotipo, manifestado por la diferente densidad antigénica de los antígenos estudiados en la membrana celular; en la respuesta proliferativa de las células B leucémicas a la IL-2, al PDB, al SAC₂ y a la IL-6; en la producción y secreción de IL-6 por parte de los linfocitos B en cultivo; en la capacidad de inducir la producción de IgM en contacto con dichas citocinas y el éster de forbol; en la proliferación celular espontánea y en la respuesta obtenida frente a un anticuerpo específico frente a la IL-6; y en el porcentaje de linfocitos B leucémicos que sufren apoptosis espontánea cuando se realizan los cultivos celulares.

Otros datos que apoyarían esta heterogeneidad interclónica en la LLC-B serían: la diferente respuesta proliferativa de las células B leucémicas frente al TNF α (Álvarez-Mon y col., 1993; Dighiero y col., 1991; Jabbar y col., 1994), IL-4 (Kawano y col., 1989; Reittie y Hoffbrand, 1994), IL-10 (Fluckiger y col., 1994), IL-14 (Karray y col., 1987), TGF β (Moore y col., 1993; Lagneaux y col., 1994), TNF β (Álvarez-Mon y col., 1993), IFN α (Panayiotidis y col., 1994b) e IFN γ (McManus y col., 1993); el efecto variable de las diversas citocinas sobre los linfocitos B neoplásicos en relación a la inhibición de la apoptosis espontánea (Fluckiger y col., 1994; Rojas y col., 1994; Castejón y col., 1995); la presencia variable de los diferentes receptores de las citocinas en la membrana de superficie de los linfocitos B de la LLC-B (Dadmarz y col., 1988); la inducción variable de las proteínas jun y fos por parte del TNF α en las células B con LLC-B (Jabbar y col., 1994); la heterogeneidad clínica (Montserrat, 1992), inmunofenotípica (De Rossi y col., 1993; Ginaldi y col., 1994) y en la respuesta al tratamiento (Kipps, 1995; O'Brien y col., 1995) de los pacientes con LLC-B.

La IL-6, según los resultados de este trabajo, podría considerarse como un factor autocrino negativo en la LLC-B. Así, la IL-6 secretada por los linfocitos B tumorales inhibe su proliferación al entrar en contacto con su receptor de membrana, presente en esas mismas células. Esta acción revierte de forma

específica mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal frente a la IL-6 (Figura 30).

Los hallazgos objetivados en este estudio de investigación hacen hincapié en la heterogeneidad de la LLC-B, al tiempo que dejan la puerta abierta a nuevos proyectos de investigación encaminados a profundizar en la fisiopatología de este proceso linfoproliferativo.

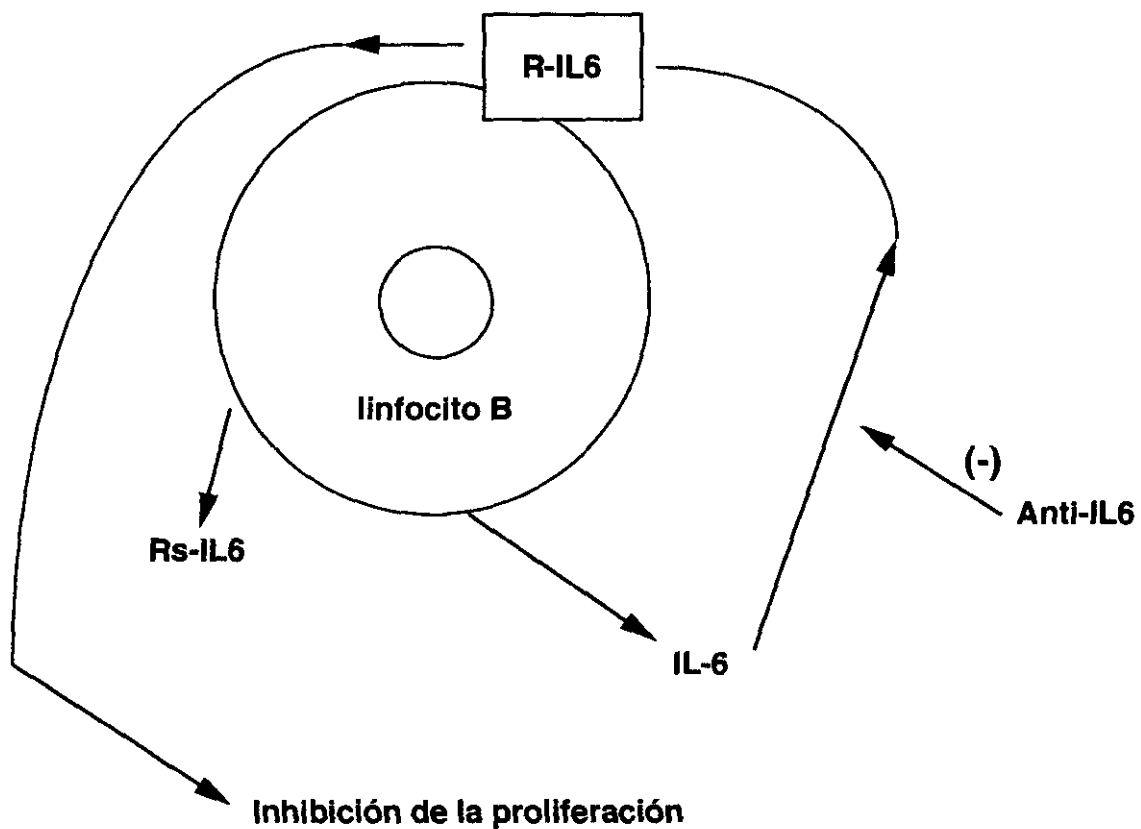


FIGURA 30. La IL-6 como factor autocrino negativo en la LLC-B.

CONCLUSIONES

1. El linfocito B de la LLC-B coexpresa los antígenos de superficie CD5, CD19, CD20, HLA DR e inmunoglobulina de superficie, ésta última de forma débil. El antígeno CD19 identifica con mayor precisión el fenotipo B de la LLC-B que el CD20, por presentar éste una menor densidad antigénica en los linfocitos tumorales.
2. El éster de forbol no estimula la proliferación celular leucémica e induce de forma heterogénea la secreción de IgM por parte de los linfocitos B de la LLC-B.
3. Los linfocitos B de los pacientes con LLC-B expresan en su membrana, de forma constitutiva, la cadena α del R-IL2 (CD25) en un 76% de los casos. Sin embargo, la IL-2 no constituye de forma consistente un factor de crecimiento *in vitro* para la LLC-B, aunque existe una relación directa entre la presencia del CD25 y la proliferación celular inducida por esta citocina. La IL-2 estimula de forma heterogénea la secreción de IgM por parte de los linfocitos leucémicos.
4. Los linfocitos B leucémicos expresan de forma constitutiva el R-IL6, en un porcentaje mayor en los pacientes incluidos en el grupo de riesgo bajo (estadio 0) con relación a los del grupo de riesgo intermedio (estadios I y II) de la clasificación de Rai. Por ser el R-IL6, al igual que el CD25, un antígeno de activación, estos linfocitos pueden ser considerados como células activadas.
5. La IL-6 no estimula la proliferación de las células de la LLC-B ni induce su diferenciación. Por el contrario, con algunas de las dosis empleadas inhibe su proliferación. Sin embargo, la proliferación espontánea de los linfocitos B leucémicos aumenta en presencia de un anticuerpo específico frente a la IL-6. Esto sugiere que la IL-6 endógena inhibe la proliferación celular leucémica de forma específica, al revertir esa acción en presencia de un anticuerpo frente a esta citocina.
6. Los linfocitos B leucémicos producen IL-6 tanto en situación basal como en presencia de un éster del forbol (PDB). En los pacientes pertenecientes al grupo de riesgo bajo (estadio 0), se han detectado niveles séricos

inferiores del receptor soluble y una expresión mayor del receptor de membrana de la IL-6 que en los pacientes del grupo intermedio, lo que iría en relación con el mayor efecto inhibitorio de la IL-6 en estadios precoces de la enfermedad. Así, se encontró que la proliferación espontánea de los linfocitos B leucémicos fue inferior en los pacientes del grupo de riesgo bajo que en los del grupo de riesgo intermedio, si bien de forma no significativa. Sin embargo, estos hallazgos no van unidos a una producción mayor de IL-6 por parte de los linfocitos B leucémicos en estadios precoces.

BIBLIOGRAFÍA

- Aarden, L., Lansdorp, P. & De Groot, E. (1985). A growth factor for B cell hybridomas produced by human monocytes. *Lymphokines*, 10, 175-185.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pober, J. S. (1994). Cytokines. En: *Cellular and molecular immunology*. W. B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania. 240-260.
- Adami, F., Guarini, A., Pini, M. & al. (1994). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur. J. Cancer.*, 30A, 1259-1263.
- Aderka, D., Maor, Y., Novick, D. & al. (1993). Interleukin-6 inhibits the proliferation of B-Chronic Lymphocytic Leukemia cells that is induced by Tumor Necrosis Factor- α or - β . *Blood*, 81, 2076-2084.
- Aguilar-Santelises, M., Amador, J. F., Mellstedt, H. & Jondal, M. (1989). Low IL-1 beta production in leukemic cells from progressive B cell chronic leukemia. *Leuk. Res.*, 13, 937-942.
- Aguilar-Santelises, M., Magnusson, R., Svenson, S. B. & al. (1991). Expression of interleukin-1 α , interleukin-1 β and interleukin-6 in chronic B lymphocytic leukemia (B-CLL) cells from patients at different stages of disease progression. *Clin. Exp. Immunol.*, 84, 422-428.
- Aguilar-Santelises, M., Loftenius, A., Ljungh, C. & al. (1992). Serum levels of helper factors (IL-1 alpha, IL-1 beta and IL-6), T cell products (sCD4 and sCD8), sIL-2R and beta 2 microglobulin in patients with B-CLL and benign B lymphocytosis. *Leuk. Res.*, 16, 607-613.
- Aguilar-Santelises, M., Mellstedt, H. & Jondal, M. (1993). Membrane expression of IL-1 alpha in chronic B lymphocytic leukemia. *Immunol. Lett.*, 37, 7-12.
- Aguilar-Santelises, M., Mellstedt, H. & Jondal, M. (1994). Leukemic cells from progressive B-CLL respond strongly to growth stimulation in vitro. *Leukemia*, 8, 1146-1152.
- Akashi, K. (1993). The role of interleukin-4 in the negative regulation of leukemia cell growth. *Leuk. Lymphoma.*, 9, 205-209.
- Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T. (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.*, 54, 1-78.
- Alfinito, F., Lamberti, A., Capobianchi, M. R. & al. (1994). T cell growth-promoting activity of interferon gamma. Mitogenic effect of the recombinant cytokine on cells from a human T-chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 8, 1294-1300.
- Allison, M. A. K., Jones, S. E. & McGuffey, P. (1989). Phase II trial of outpatient interleukin-2 in malignant lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, and selected solid tumors. *J. Clin. Oncol.*, 7, 75-80.
- Álvarez-Mon, M., Casas, J., Laguna, R., Toribio, M. L., Ortiz de Landázuri, M. & Duránte, A. (1986). Lymphokine induction of NK-like cytotoxicity in T cells from B-CLL. *Blood*, 67, 228-232.
- Álvarez-Mon, M., Casas, J., Laguna, R., Jordá, J. & Duránte, A. (1987). Clinical signification of natural killer activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur. J. Haematol.*, 38, 268-273.
- Álvarez-Mon, M., de la Hera, A., Gaspar, M. L. & al. (1989). Proliferation of B cells from chronic lymphocytic leukemia is selectively promoted by B cell growth factor. *Acta Haematol.*, 81, 91-97.
- Álvarez-Mon, M., García-Suárez, J., Prieto, A. & al. (1993). Heterogenous proliferative effect of tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin on mitogen-activated B cells from B-chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.*, 43, 81-85.
- Aracil, M. (1994). Regulación de la hematopoyesis: III. Receptores de citoquinas y moléculas de adhesión. En: *Hematología Experimental. Curso teórico-práctico*. J. A. Bueren, C. Tejero Ortego, Eds. Editorial Ciemat. Madrid. 7c1-7c15.
- Arend, W. P. (1993). Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv. Immunol.*, 54, 167-227.

- Armitage, R. J., Macduff, B. M., Eisenmann, J., Paxton, R. & Grabstein, K. H. (1995). IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J. Immunol.*, 154, 483-490.
- Arza, B., García-Die, F. & Hernández-Bronchud, M. (1994). Perspectivas de la inmunoterapia en el cáncer. *Biol. Clín. Hematol.*, 16, 187-208.
- Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.*, 55, 97-179.
- Baier, M., Werner, A., Bannert, N., Metzner, K. & Kurth, R. (1995). HIV suppression by interleukin-16. *Nature*, 378, 563.
- Ballester, O. F., Moscinski, L. C., Lyman, G. H. & al. (1994). High levels of interleukin-6 are associated with low tumor burden and low growth fraction in multiple myeloma. *Blood*, 83, 1903-1908.
- Banchereau, J. & Rousset, F. (1992). Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. *Adv. Immunol.*, 52, 125-262.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D. & al. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 881-922.
- Barak, V., Ginzburg, M., Kalickman, I. & Polliack, A. (1992). Serum soluble interleukin-2 receptor levels are associated with clinical disease status and histopathological grade in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma.*, 7, 431-438.
- Barclay, A. N., Birkeland, M. L., Brown, M. M. & al. (1993). En : *The Leucocyte antigen*. Academic Press Limited. San Diego, CA, USA.
- Barlogie, B. & Gale, R. P. (1992). Multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia: parallels and constrasts. *Am. J. Med.*, 93, 443-450.
- Barut, B., Chauan, D., Uchiyama, H. & Anderson, K. C. (1993). Interleukin-6 functions as an intracellular growth factor in Hairy Cell Leukemia in vitro. *J. Clin. Invest.*, 92, 2346-2352.
- Bataille, R., Jourdan, M., Zhang, X. G. & Klein, B. (1989). Serum levels of interleukin-6, a potent myeloma cell growth factor as a reflection of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J Clin Invest.*, 84, 2008-2011.
- Batata, A. & Shen, B. (1992). Immunophenotyping of subtypes of B-chronic (mature) lymphoid leukemia. A study of 242 cases. *Cancer*, 70, 2436-2443.
- Bauer, J., Bauer, T. M., Kalb, T. & al. (1989). Regulation of interleukin 6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J. Exp. Med.*, 170, 1537-1549.
- Baumann, M. A., Paul, C. C., Mahrer, S., Tolbert, M. & Grace, M. J. (1992). Expression of IL-5 receptors by human B-lymphocytes. *Blood*, 80, 1705, 429a.
- Beguín, Y., Lampertz, S., De Groote, D., Igot, D., Malaise, M. & Fillet, G. (1993). Soluble CD23 and other receptors (CD4, CD8, CD25, CD71) in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 7, 2019-2025.
- Bertolini, J. N., Sanderson, C. J. & Benson, E. M. (1993). Human interleukin-5 induces staphylococcal A Cowan 1 strain-activated human B cells to secrete IgM. *Eur. J. Immunol.*, 23, 398-402.
- Bevilacqua M. P. (1993). Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.*, 11, 767-804.
- Bianchi, A. C., Heslop, H. E., Drexler, H. G. & al. (1988). Effects of tumor necrosis factor and alpha interferon on chronic B cell malignancies. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 30, 317-319.
- Binet, J. L., Auguier, A., Dighiero, G. & al. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48, 198-216.

- Biondi, A., Rossi, V., Bassan, R. & al. (1989). Constitutive expression of the interleukin-6 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 73, 1279-1284.
- Bøyum, A. J. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, 21, 77-89.
- Briere, F., Bridon, J. M., Servet, C., Rousset, F., Zurawski, G. & Banchereau, J. (1993). IL-10 and IL-13 as B cell growth and differentiation factors. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 35, 233-235.
- Brizard, A., Morel, F., Lecron, J. C. & al. (1994). Proliferative response of B chronic lymphocytic leukemia lymphocytes stimulated with IL-2 and soluble CD23. *Leuk. Lymphoma.*, 14, 311-318.
- Broudy, V. C., Lin, N. L. & Kaushansky, K. (1995). Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood*, 85, 1719-1726.
- Brouet, J-C. & Seligmann, M. (1977). Chronic lymphocytic leukemia as an immunoproliferative disorder. *Baillières Clin. Hematol.*, 6, 169-184.
- Brown, T. J., Liu, J., Brashem-Stein, C. & Shoyab, M. (1993). Regulation of granulocyte-stimulating factor expression by oncostatin M. *Blood*, 82, 33-37.
- Burger, R., Wendler, J., Antoni, K., Helm, G., Kalden, J. R. & Gramatzki, M. (1994). Interleukin-6 production in B-cell neoplasias and Castleman's disease: evidence for an additional paracrine loop. *Ann. Hematol.*, 69, 25-31.
- Burke, F., Griffin, D., Elwood, N. & al. (1993). The effect of cytokines on cultured mononuclear cells from patients with B cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol.*, 11, 23-33.
- Burrows, P. D., Kearney, J. F., Schroeder, H. W. & Cooper, M. D. (1993). Normal B lymphocyte differentiation. *Baillières Clin. Hematol.*, 6, 785-806.
- Burton, J. D., Weitz, C. H. & Kay, N. E. (1989). Malignant chronic lymphocytic leukemia B cells elaborate soluble factors that down-regulate T cell and NK function. *Am. J. Hematol.*, 30, 61-67.
- Burton, J. & Kay, N. E. (1994). Does IL-2 receptor expression and secretion in chronic B-cell leukemia have a role in down-regulation of the immune system? *Leukemia*, 8, 92-96.
- Buschle, M., Campana, D., Carding, S. R., Richard, C., Hoffbrand, A. V. & Brenner, M. K. (1993). Interferon γ inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.*, 177, 213-218.
- Caligaris-Cappio, F., Bergui, L., Gaidano, G. L. & al. (1989). Circulating malignant precursors in monoclonal gammopathies. *Eur. J. Haematol. Suppl.*, 51, 27-29.
- Caligaris-Cappio, F., Ghia, P., Gottardi, D. & al. (1992). BCL2 in B-chronic lymphocytic leukemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 182, 279-286.
- Carlsson, M., Tötterman, T. H., Rosen, A. & Nilsson, K. (1989). Interleukin 2 and a T cell hybridoma (MP6) derived B cell-stimulatory factor act synergistically to induce proliferation and differentiation of human B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 3, 593-601.
- Carlsson, M., Sundström, L., Bengtsson, M., Tötterman, T. H., Rosen, A. & Nilsson, K. (1989). Interleukin 4 strongly augments or inhibits DNA synthesis and differentiation of B-type chronic lymphocytic leukemia cells depending on the costimulatory activation and progression signal. *Eur. J. Immunol.*, 19, 913-921.
- Carrión, F., Reyes, E., Prieto, A. & al. (1995). Heterogénea producción de interleucina 6 por linfocitos B de pacientes con leucemia linfática crónica B (LLC-B). *Sangre*, 40, 136, 474a.
- Carson, W. E., Giri, J. G., Lindemann, M. J. & al. (1994). Interleukin 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.*, 180, 1395-1403.

- Castejón, R., Vargas, J. A., Gea-Banacloche, J. C. & al. (1995). Efecto in vitro de la interleucina 2 sobre la muerte celular por apoptosis en la leucemia linfática crónica B. IV Congreso de la Sociedad Ibérica de Citometría, 76.
- Catovsky, D. & Foa, R. (1990_a). Immunological markers. En: *The Lymphoid Leukemias*. Editorial Butterworths, 1-31.
- Catovsky, D. & Foa, R. (1990_b). B-cell chronic lymphocytic leukemia. En: *The Lymphoid Leukemias*. Editorial Butterworths., 73-113.
- Cavaillon, J. M. (1993). Interleukine-6. En: *Les cytokines*. J. M. Cavaillon Ed. Masson. Paris, 183-196.
- Cemerlic, D., Dadey, B., Han, T. & Vaickus, L. (1991). Cytokine influence on killing of fresh chronic lymphocytic leukemia cells by human leukocytes. *Blood*, 77, 2707-2715.
- Chaouchi, N., Tertian, G., Wallon, C. & al. (1993). Interferon alpha prevents in vitro apoptosis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 82, 1547, 391a.
- Cheson, B. D., Bennett, J. M., Rai, K. R. & al. (1988). Guideline for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the National Cancer Institute-sponsored working group. *Am. J. Hematol.*, 29, 152-163.
- Cheson, B. D. (1991). Chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Curr. Opin. Oncol.*, 3, 54-62.
- Collins, J. R., Verschuer, L. A., Harmon, B. V., Prentice, R. L., Pope, J. H., Kerr, J. F. (1989). Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukemia cells following their culture in vitro. *Br. J. Haematol.*, 71, 343-350.
- Cooperative group for the study of immunoglobulin in chronic lymphocytic leukemia. (1988). Intravenous immunoglobulin for the prevention of infection in chronic lymphocytic leukemia. *N. Eng. J. Med.*, 319, 902-907.
- Corcione, A., Baldi, L., Zupo, S., Dono, M., Ferrarini, M. & Pistoia, V. (1992). Production of granulocyte-colony stimulating factor by normal and neoplastic human B lymphocytes. *Blood*, 80, 1706, 429a.
- Cordingley, F. T., Hoffbrand, A. V., Heslop, H. E. & al. (1988). Tumor necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet*, 1, 969-971.
- Corsetti, J. P., Sotirchos, S. V., Cox, C., Cowles, J. W., Leary, J. F. & Blumberg, N. (1988). Correction of cellular autofluorescence in flow cytometry by mathematical modeling of cellular fluorescence. *Cytometry*, 9, 539-547.
- Craig, V. A., Mainou-Fowler, T. & Prentice, A. G. (1993). Effect of Interleukin-4 and dexamethasone on apoptosis and bcl-2 expression in B-chronic lymphocytic leukemia in culture. *Exp. Hematol.*, 21, 1090, 294a.
- Crawford, D. H. & Catovsky, D. (1993). In vitro activation of leukemic B cells by interleukin-4 and antibodies to CD40. *Immunology*, 80, 40-44.
- Dadmarz, R., Evans, T., Secher, D., Marshall, N. & Cawley, J. C. (1986). The mechanisms of action of interferon (IFN- α) in hairy-cell leukaemia, Hu-IFN2 receptor expression by hairy cells and other normal and leukemic cell types. *Leuk. Res.*, 10, 1279-1285.
- Dadmarz, R. & Cawley, J. C. (1988). Heterogeneity of CLL: high CD23 antigen and α IFN receptor expression are features of favourable disease and of cell activation. *Br. J. Haematol.*, 68, 279-282.
- Dahlke, E., Schlag, R., Langenmayer, I. & al. (1995). Decreased production of TNF and IL-6 in whole blood of CLL patients. *Am. J. Hematol.*, 49, 76-82.
- Dancescu, M., Rubio-Trujillo, M., Biron, G., Bron, D., Delespesse, G. & Sarfati, M. (1992). Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J. Exp. Med.*, 176, 1319-1326.

- De Castro, J., Arroyo, M. & León, A. (1994). Factores pronósticos en los procesos linfoproliferativos crónicos: leucemia linfóide crónica, tricoleucemia y leucemia prolinfocítica. En: *Factores pronósticos en oncología*. M. González Barón, Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España,
- Defrance, T., Carayon, P., Billian, G. & al. (1994). Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J. Exp. Med.*, 179, 135-143.
- De Rossi, G., Zarcone, D., Mauro, F. & al. (1993). Adhesion molecule expression on B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia cells: malignant cell phenotypes define distinct disease subsets. *Blood*, 81, 2679-2687.
- Di Celle, P. F., Carbone, A., Marchis, D. & al. (1994). Cytokine gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of constitutive interleukin-8 (IL-8) mRNA expression and secretion of biologically active IL-8 protein. *Blood*, 84, 220-228.
- Digel, W., Stefanic, M., Schöniger, W. & al. (1988). Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 73, 1242-1246.
- Digel, W., Schmid, M., Heil, G., Conrad, P., Gillis, S. & Porzsolt, F. (1991). Human interleukin-7 induces proliferation of neoplastic cells from chronic lymphocytic leukemia and acute leukemias. *Blood*, 78, 753-759.
- Digel, W., Porzsolt, F., Schmid, M., Herrmann, F., Lesslauer, W. & Brockhaus, M. (1992). High levels of circulating soluble receptors for tumor necrosis factor in hairy cell leukemia and type B chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Invest.*, 89, 1690-1693.
- Di Giovine, F. S. & Duff, G. W. (1990). Interleukin 1: the first interleukin. *Immunol. Today.*, 11, 13-20.
- Dighiero, G., Travade, P., Chevret, S. & al. (1991). B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. *Blood*, 78, 1901-1914.
- Dighiero, G. (1992). Biología de la leucemia linfática crónica. En: *Leucemia Linfática Crónica B. Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*. A. López Borrasca, C. L. Arocha Piñango, C. C. Campos Guerra, A. Parreira, S. Paulovsky, G. Ruíz Argüelles, J. F. San Miguel, Eds. Ediciones Universidad Salamanca. II, 304-309.
- Dighiero, G. (1993). Biology of the neoplastic lymphocyte in B-CLL. *Baillieres Clin. Hematol.*, 6, 807-820.
- Drexler, H. G., Brenner, M. K., Coustan-Smith, E., Wickremasinghe, R. G. & Hoffbrand, A. V. (1987). Synergistic action of calcium ionophore A23187 and Phorbol ester TPA on B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 70, 1536-1542.
- Drexler, H. G. (1989). Which cells do respond during in vitro stimulation of B-CLL and HCL cultures? *Leukemia*, 3, 240-241.
- Duensing, S. & Atzpodien, J. (1995). Increased intracellular and plasma levels of basic fibroblast growth factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 85, 1978-1980.
- Dumcombe, A. S., Heslop, H. E., Turner, M. & al. (1989). Tumor necrosis factor mediates autocrine growth inhibition in a chronic leukemia. *J. Immunol.*, 143, 3828-3834.
- DuVillard, L., Guiguet, M., Casasnovas, R-O. & al. (1995). Diagnostic value of serum IL-6 level in monoclonal gammopathies. *Br. J. Haematol.*, 89, 243-249.
- El Rouby, S., Bayona, W., Pisharody, S. M. & Newcomb, E. W. (1992). p53 mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 182, 313-317.
- Engel, P., Ingles, J., de la Calle, O. & Gallart, T. (1989). Cellular activation without proliferation to B cell growth factor and interleukin 2 in chronic lymphocytic leukemia B cells stimulated with phorbol ester plus calcium ionophore. *Clin. Exp. Immunol.*, 76, 61-67.
- Fauci, A. S. (1995). An elusive soluble suppressor. *Nature*, 378, 561.

- Finke, J., Ternes, P., Lange, W., Mertelsmann, R. & Dolken, G. (1993). Expression of interleukin 10 in B lymphocytes of different origin. *Leukemia*, 7, 1852-1857.
- Fisher, D. G., Hubbard, W. J. & Koren, H. S. (1981). Tumor cell killing by freshly isolated peripheral blood monocytes. *Cell Immunol.*, 58, 426.
- Fluckiger, A-C., Rossi, J. F., Bussel, A., Bryon, P., Banchereau, J. & Defrance, T. (1992). Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood*, 80, 3173-3181.
- Fluckiger, A-C., Garrone, P., Durand, I., Galizzi, J. P. & Banchereau, J. (1993). Interleukin 10 upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 178, 1473-1481.
- Fluckiger, A-C., Briere, F., Zurawski, G., Bridon, J. M. & Banchereau, J. (1994). IL-13 has only a subset of IL-4-like activities on B chronic lymphocytic leukemia cells. *Immunology*, 83, 397-403.
- Fluckiger, A-C., Durand, I. & Banchereau, J. (1994). Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *J. Exp. Med.*, 179, 91-99.
- Foa, R., Giovarelli, M., Jemma, C. & al. (1985). Interleukin 2 (IL-2) and interferon γ production by T lymphocytes from patients with B-chronic lymphocytic leukemia: evidence that normally released IL-2 is absorbed by the neoplastic B cell population. *Blood*, 66, 614-619.
- Foa, R., Fierro, M. T., Lusso, P. & al. (1986). Reduced natural killer T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia identified by three monoclonal antibodies: Leu-11, A 10, AB8. 28. *Br. J. Hematol.*, 62, 151-154.
- Foa, R., Massaia, M., Cardona, S. & al. (1990). Production of tumor necrosis factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. *Blood*, 76, 393-400.
- Foon, K. A., Rai, K. R. & Gale, R. P. (1990). Chronic lymphocytic leukemia: new insights into biology and therapy. *Ann. Intern. Med.*, 113, 525-539.
- Ford, R., Tamayo, A., Martin, B. & al. (1995). Identification of B-cell growth factors (IL-14, high molecular weight-B-cell growth factors) in effusion fluids from patients with aggressive B-cell lymphoma. *Blood*, 86, 283-293.
- Fourcin, M., Chevalier, S., Lebrun, J. J. & al. (1994). Involvement of gp130/interleukin-6 receptor transducing component in interleukin-11 receptor. *Eur. J. Immunol.*, 24, 277-280.
- Fournier, S., Delespesse, G., Rubio, M., Biron, G. & Sarfati, M. (1992). CD23 antigen regulation and signaling in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Invest.*, 89, 1312-1321.
- Freedman, A. S., Boyd, A. W., Bieber, F. R. & al. (1987). Normal cellular counterparts of B cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 70, 418-427.
- Freedman, A. S. & Nadler, L. M. (1987). B cell development in chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Hematol.*, 24, 230-239.
- Freedman, A. S. (1990). Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, 4, 405-429.
- Freeman, G. J., Freedman, A. S., Rabinowe, S. N. & al. (1989). Interleukin 6 gene expression in normal and neoplastic B cells. *J. Clin. Invest.*, 83, 1512-1518.
- French Co-operative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. (1990). Natural history of stage A chronic lymphocytic leukemia untreated patients. *Br. J. Haematol.*, 76, 45-57.
- Frishman, J., Long, B., Knospe, W., Gregory, S. & Plate, J. (1993). Genes for interleukin 7 are transcribed in leukemic cell subsets of individuals with chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.*, 177, 955-964.

- Galanaud, P., Karray, S. & Llorente, L. (1990). Regulatory effects of IL-4 on human B-cell response to IL-2. *Eur. Cytokine. Netw.*, 1, 57-64.
- Gale, R. P. & Foon, K. A. (1987). Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Hematol.*, 24, 209-229.
- Gale, R. P., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Keating, M., Montserrat, M. & Rai, K., for the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. (1994). Recent progress in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 8, 1610-1614.
- Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. & Baumann, H. (1987). Interferon β /B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 7251-7256.
- Gearing, D. P. (1993). The leukemia inhibitory factor and its receptor. *Adv. Immunol.*, 53, 31-58.
- Gilleece, M. H., Heyworth, C. M., Testa, N. G. & Dexter, T. M. (1993). Interleukin-4 receptor expression in chronic lymphocytic leukemia. *Exp. Hematol.*, 21, 1073, 233a.
- Ginaldi, L., De Martinis, M., D'Ostilio, A., Marini, L., Di Gennari, A. & Quaglino, D. (1994). B-cell chronic lymphocytic leukemia: immunophenotypical studies. *Blood*, 84, 654a, 2600.
- Grossbard, M. L., Freedman, A. S., Ritz, J. & al. (1992). Serotherapy of B-cell neoplasms with anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of daily bolus infusion. *Blood*, 79, 576-?.
- Haegeman, G., Content, J., Volckaert, G., Derynck, R., Tavernier, J. & Fiers, W. (1986). Structural analysis of the sequence encoding for an inducible 26-KDa protein in human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.*, 159, 625-632.
- Hamblin, T. J., Oscier, D. G. & Young, B. J. (1986). Autoimmunity in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Pathol.*, 39, 713-716.
- Hahn, T., Kusminsky, G., Bassous, L., Barak, T. & Berrebi, A. (1989). Tumor necrosis factor in B chronic lymphocytic leukemia. *Br. J. Haematol.*, 71, 299.
- Han, T., Barcos, M., Enrigh, L. & al. (1984). Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia: correlations with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic data. *J. Clin. Oncol.*, 2, 562-570.
- Han, T., Ozer, H., Sadamori, N. & al. (1984). Prognostic importance of cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 310, 288-292.
- Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E. & Reed, J. C. (1993). Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 82, 1820-1828.
- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Li, Y. S. & Hayakawa, K. (1994). Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5+ B cells. *Immunol. Rev.*, 137, 91-118.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Stein, H. & al. (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. *Blood*, 84, 1361-1392.
- Hayes, T. G., Tan, X. L., Moseley, A. B., Huston, M. M. & Huston, D. P. (1993). Abnormal response to IL-5 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.*, 17, 777-783.
- Henney, C. S. (1989). Interleukin-7: effects on early events in lymphopoiesis. *Immunol. Today.*, 10, 170-173.
- Heslop, H. E., Bianchi, A. C. M., Cordingley, F. T. & al. (1990). Effects of interferon α on autocrine growth factor loops in B lymphoproliferative disorders. *J. Exp. Med.*, 172, 1729-1734.
- Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. & Kishimoto, T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp 130. *Cell*, 63, 1149-1157.

- Hirano, T., Teranishi, T., Lin, B. & Onoue, K. (1984). Human T cell factor(s) IV. Demonstration of a human late-acting B cell differentiation factor acting on Staphylococcus aureus Cowan I-stimulated B cells. *J. Immunol.*, 133, 798-802.
- Hirano, T., Taga, T., Nakano, N. & al. (1985). Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 5490-5494.
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H. & al. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324, 73-76.
- Hirano, T., Taga, T., Yasukawa, K. & al. (1987). Human B cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 228-231.
- Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M. & al. (1988). Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 18, 1797-1801.
- Hirano, T. (1992). The biology of interleukin-6. *Chem. Immunol.*, 51, 153-180.
- Hirano, T. (1992b). Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 62, S60-S65.
- Hirata, Y., Taga, T., Hibi, M., Nakano, N., Hirano, T. & Kishimoto, T. (1989). Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.*, 143, 2900-2906.
- Hitzler, J. K., Martínez-Valdez, H., Bergsagel, D. B., Minden, M. D. & Messner, H. A. (1991). Role of interleukin 6 in the proliferation of human multiple myeloma cell lines OCI-My 1 to 7 established from patients with advanced stage of the disease. *Blood*, 78, 1996-2004.
- Hivroz, C., Valle, A., Brouet, J. C., Banchereau, J. & Grillo-Courvalin, C. (1989). Regulation by interleukin 2 of CD23 expression of leukemic and normal B cells: comparison with interleukin 4. *Eur. J. Immunol.*, 19, 1025-1030.
- Hockenbery, D., Núñez, G., Millman, C., Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S. J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348, 334-336.
- Hoffbrand, A. V., Panayiotidis, P., Reittie, J. & Ganeshaguru, K. (1993). Autocrine and paracrine growth loops in chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Hematol.*, 30, 306-317.
- Hoffman, R. (1989). Regulation of megakaryocytopoiesis. *Blood*, 74, 1196-1212.
- Hokland, P., Geisler, C. H., Anderssen, E., Drivsholm, A., Hansen, M. M. & Meyer, K. (1992). Mouse erythrocyte rosette formation with malignant human B-lymphocytes re-evaluated: still a useful marker for differentiating mature B-cell malignancies. *Br. J. Hematol.*, 82, 560-564.
- Hollen, C. W., Henthorn, J., Koziol, J. A. & Burstein, S. A. (1991). Elevated serum interleukin-6 levels in patients with reactive thrombocytosis. *Br. J. Hematol.*, 79, 286-290.
- Honda, M., Yamamoto, S., Cheng, M. & al. (1992). Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J. Immunol.*, 148, 2175-2180.
- Horan, P. K., Slezak, S. E. & Poste, G. (1986). Improved flow cytometric analysis of leukocyte subsets: simultaneous identification on five cell subsets using two-color immunofluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 8361-8365.
- Huang, R. W., Tsuda, H. & Takatsuki, K. (1993). Interleukin-2 prevents programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells. *Int. J. Hematol.*, 58, 83-92.
- Ikebuchi, K., Wong, G. G., Clark, S. C., Ihle, J. N., Hirai, Y. & Ogawa, M. (1987). Interleukin 6 enhancement of interleukin-3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 9035-9039.

- Ikematsu, W., Ikematsu, H., Okamura, S., Otsuka, T., Harada, M. & Niho, Y. (1994). Surface phenotype and Ig heavy-chain gene usage in chronic B-cell leukemias: expression of myelomonocytic surface markers in CD5⁻ chronic B-cell leukemia. *Blood*, 83, 2602-2610.
- Imamura, J., Miyoshi, I. & Koeffler, P. (1994). p53 in hematologic malignancies. *Blood*, 84, 2412-2421.
- International Workshop on CLL. (1981). Chronic lymphocytic leukemia: proposals for a revised prognostic staging system. *Br. J. Hematol.*, 48, 365-367.
- International Workshop on CLL. (1989). Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. *Ann. Intern. Med.*, 110, 236-238.
- Ishibashi, T., Kimura, H., Shikawa, Y. & al. (1989). Interleukin 6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood*, 74, 1241-1244.
- Ishibashi, T., Kimura, H., Uchida, T., Kariyone, S., Friese, P. & Burstein, S. A. (1989). Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, 5953-5957.
- Israels, L. G., Israels, S. J., Begleiter, A. & al. (1993). Role of transforming growth factor-beta in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leuk. Res.*, 17, 81-87.
- Itoh, K. & Hirohata, S. (1995). The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J. Immunol.*, 154, 4341-4350.
- Jabbar, S. A. B., Hoffbrand, V. & Wickremasinghe, G. (1994). Regulation of transcription factors NFkB and AP-1 following tumour necrosis factor- α treatment of cells from B cell chronic lymphocytic leukaemia patients. *Br. J. Haematol.*, 86, 496-504.
- Jansen, J. H., Fibbe, W. E., Wientjens, G. J., Willemze, R. & Kluin-Nelemans, J. C. (1993). Inhibitory effect of interleukin-4 on the proliferation of acute myeloid leukemia cells with myelo-monocytic differentiation (AML-M4/M5); the role of interleukin-6. *Leukemia*, 7, 643-645.
- Jewell, A. P., Worman, C. P., Giles, F. J., Goldstone, A. H. & Lydyard, P. M. (1992). Resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to interferon-alpha generated lymphokine activated killer cells. *Leuk. Lymphoma.*, 7, 473-480.
- Jewell, A. P., Worman, C. P., Giles, F. J., Lydyard, P. M. & Goldstone, A. H. (1993). Cytokine regulation of apoptosis of B-CLL cells in vitro. *Blood*, 82, 2254, 567a.
- Jewell, A. P., Yong, K. L., Worman, C. P., Tsakona, C. P., Giles, F. J. & Goldstone, A. H. (1994_a). Serum macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) levels correlate with clinical response to interferon-alpha in patients with early-stage B-CLL. *Br. J. Haematol.*, 86, 441-443.
- Jewell, A. P., Worman, C. P., Lydyard, P. M., Yong, K. L., Giles, F. J. & Goldstone, A. H. (1994_b). Interferon-alpha up-regulates bcl-2 expression and protects B-CLL cells from apoptosis in vitro and in vivo. *Br. J. Haematol.*, 88, 268-274.
- Jondal, M., Holm, G. & Wigzell, H. (1972). Surface markers of human T and B lymphocytes I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.*, 136, 207-215.
- Juliusson, G., Robert, K. H., Ost, A. & al. (1985). Prognostic information from cytogenetic analysis in chronic B-lymphocytic leukemia and leukemia immunocytoma. *Blood.*, 65, 134-141.
- Juliusson, G., Friberg, K. & Gahrton, G. (1988). Consistency of chromosomal aberrations in chronic B-lymphocytic leukemia. A longitudinal cytogenetic study of 41 patients. *Cancer*, 62, 500-506.
- Juliusson, G. & Gahrton, G. (1990). Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications. *Cancer. Genet. Cytogenet.*, 45, 143-160.
- Juliusson, G. & Gahrton, G. (1993). Cytogenetics in CLL and related disorders. *Baillières Clin. Hematol.*, 6, 821-848.

- Kaplan, M. E., Woodson, M. & Clark, C. (1976). Detection of human lymphocytes by rosette formation with AET-treated sheep red cells. En: *In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity*. B. R. Blom, J. R. David, Eds. New York, Academy Press, 83.
- Karray, S., Merle-Béral, H., Vazquez, A., Gerard, J-P., Debré, P. & Galanaud, P. (1987). Functional heterogeneity of B-CLL lymphocytes: dissociated responsiveness to growth factors and distinct requirements for a first activation signal. *Blood*, 70, 1105-1110.
- Karray, S., DeFrance, T., Merle-Béral, H., Banchereau, J., Debré, P. & Galanaud, P. (1988_a). Interleukin 4 counteracts the interleukin 2-induced proliferation of monoclonal B cells. *J. Exp. Med.*, 168, 85-94.
- Karray, S., Delfraissy, J-F., Merle-Béral, H., Wallon, C., Debré, P. & Galanaud, P. (1988_b). Positive effects of interferon- α on B cell-type chronic lymphocytic leukemia proliferative response. *J. Immunol.*, 140, 774-778.
- Karray, S., Emilie, D. & Galanaud, P. (1988_c). In vitro effects of B cell growth and maturation factor on B-CLL lymphocytes. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 30, 275-278.
- Kaushausky, K. (1995). Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*, 86, 419-431.
- Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T. & al. (1988). Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*, 332, 83-85.
- Kawano, M., Iwato, K., Asaoku, H. & al. (1989). Heterogenous response of B cell chronic lymphocytic leukemia cells to anti-human IgM antibody (anti- μ) and B cell stimulatory factor 1 (BSF-1). *Br. J. Haematol.*, 71, 47-51.
- Kay, N. E. & Kaplan, M. E. (1986). Defective T cell responsiveness in chronic lymphocytic leukemia: analysis of activation events. *Blood*, 67, 578-581.
- Kay, N. E., Burton, J., Wagner, D. & Nelson, D. L. (1988). The malignant B cells from B-chronic lymphocytic leukemia patients release TAC-soluble interleukin-2 receptors. *Blood*, 72, 447-450.
- Keating, M. J. (1991). Treatment of chronic lymphocytic leukemia. En: *Therapy of hematopoietic neoplasia*. E. J. Freireich, H. Kantarjian, Eds. Marcel Dekker, Inc., 175-204.
- Keating, M. J. (1993). Chronic lymphoproliferative disorders: chronic lymphocytic leukemia and hairy-cell leukemia. *Curr. Opin. Oncol.*, 5, 35-41.
- Kimura, A., Hyodo, H., Nakata, Y. & Kuramoto, A. (1990). Chronic lymphocytic leukemia associated with bone marrow fibrosis: possible role of interleukin 1 alpha in the pathogenesis. *Am. J. Hematol.*, 43, 47-50.
- Kincade, P. W. (1992). Cell interaction molecules and cytokines which participates in B lymphopoiesis. *Baillières Clin. Hematol.*, 5, 575-598.
- Kipps, T. J. & Carson, D. A. (1993). Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases. *Blood*, 81, 2475-2487.
- Kipps, T. J. (1995). Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. En: *Williams Hematology Fifth edition*. E. Beutler, M. A. Lichtman, B. S. Coller, T. J. Kipps, Eds. McGraw-Hill, Inc. 1017-1039.
- Kishimoto, T. & Hirano, T. (1988). Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annu. Rev. Immunol.*, 6, 485-512.
- Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. *Blood*, 74, 1-10.
- Kishimoto, T., Hibi, M., Murakami, M., Narazaki, M., Saito, M. & Taga, T. (1992). The molecular biology of interleukin-6 and its receptor. *1992 Polyfunctional cytokines: IL-6 and LIF*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 167), 5-23.

- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. & Taga, T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, 86, 1243-1254.
- Kitani, A., Hara, M., Hirose, T. & al. (1992). Autostimulatory effects of IL-6 on excessive B cell differentiation in patients with systemic lupus erythematosus: analysis of IL-6 production and IL-6R expression. *Clin. Exp. Immunol.*, 88, 75-83.
- Klein, B., Wijdenes, J., Zhang, X. G. & al. (1991). Murine Anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy in myeloma. *Blood*, 78, 1198-1204.
- Klein, B., Zhang, X. G., Jourdan, M. & al. (1989). Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, 73, 517-526.
- Kleine, H. D., Hinrichs, H., Scheinichen, D., Lux, E., Poliwoda, H. & Freund, M. (1992). Stimulatory effects of stem cell factor (SCF) on B-CLL cells could be determined by flow cytometry after depletion of cytokine producing cells. *Blood*, 80, 1654, 416a.
- Koote, A. M., Langelaar, R. A., Tanke, H. J., Van der Voort, E. A. & Paul, L. C. (1988). Comparison of the staining of peripheral blood T lymphocytes by various anti-CD8 and HLA-DR monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods*, 111, 75-82.
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G. & al. (1994). Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*, 368, 339-342.
- Korsmeyer, S. J. (1992). Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu. Rev. Immunol.*, 10, 785-807.
- Kurzrock, R., Kantarjian, H., Wetzler, M. & al. (1993). Ubiquitous expression of cytokines in diverse leukemias of lymphoid and myeloid lineage. *Exp. Hematol.*, 21, 80-85.
- Kyle, R. A. (1994). Why better prognostic factors for multiple myeloma are needed. *Blood*, 83, 1713-1716.
- Laberge, S., Cruikshank, W. W., Kornfeld, H. & Center, D. M. (1995). Histamine-induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8+ T cells is independent of transcription and translation. Evidence for constitutive protein synthesis and storage. *J. Immunol.*, 155, 2902-2910.
- Lagneaux, L., Delforge, A., Dorval, C., Bron, D., Bosmans, E. & Stryckmans, P. (1992). TGF β inhibits growth of hemopoietic precursors and IL-6 production by bone marrow stromal cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*, 80, 115a.
- Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D. & Stryckmans, P. (1994). Control of B-lymphocyte proliferation by transforming growth factor-beta in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*, 84, 2089, 526a.
- Laguna, R. (1983). Caracterización inmunológica y estudio funcional de la leucemia linfocítica crónica. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Lahat, N., Aghai, E., Maroun, B., Kinarty, A., Quitt, M. & Froom, P. (1991). Increased spontaneous secretion of IL-6 from B cells of patients with B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.*, 85, 302-306.
- Lang, R. A. & Burgess, A. W. (1990). Autocrine growth factors and tumorigenic transformation. *Immunol. Today*, 11, 245-249.
- Larsson, L. G., Carlsson, M., Shena, M., Lantz, M., Caligaris-Cappio, F. & Nilsson, K. (1993). Interleukin-2 enhances the production of tumor necrosis factor-alpha in activated B-type chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *Leukemia*, 7, 226-234.
- Lauria, F., Foa, R., Mantovani, V., Fierro, M. T., Catovsky, D. & Tura, S. (1974). T-cell functional abnormality in B-chronic lymphocytic leukemia: evidence of a defect of the T-helper subset. *Br. J. Haematol.*, 27, 7-23.

- Lavabre-Bertrand, T., Bachelier, M. N., Liautard, J. & al. (1992). Detection of interleukin-6 receptors (gp 80) on B-chronic lymphocytic leukemia by quantitative flow cytometry. *Blood*, 80, 1714, 431a.
- Lee, G., Namen, A. E., Gillis, S., Ellingsworth, L. R. & Kincade, P. W. (1989). Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by transforming growth factor β . *J. Immunol.*, 142, 3875-3883.
- Leger-Ravet, M. B., Peuchmaur, M., Devergne, O. & al. (1991). Interleukin-6 gene expression in Castleman's disease. *Blood*, 78, 2923-2930.
- Levy, Y., Ferman, J. P. & Brouet, J. C. (1990). Differential effects of low and high concentrations of interleukin 6 on human cells. *Eur. J. Immunol.*, 20, 2389-2393.
- Liao, F., Rabin, R. L., Yannelli, J. R., Koniaris, L. G., Vanguri, P. & Farber, J. M. (1995). Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J. Exp. Med.*, 182, 1301-1314.
- Litz, C. E. & Brunning, R. D. (1993). Chronic lymphoproliferative disorders: classification and diagnosis. *Baillières Clin. Hematol.*, 6, 767-783.
- Longobardi Givan A. (1992). En: *Flow Cytometry. First principles*. Wiley-Liss, Inc.
- Lotz, M., Ranheim, E. & Kipps, T. J. (1994). Transforming growth factor beta as endogenous growth inhibitor of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Exp. Med.*, 179, 999-1004.
- Luo, H., Rubio, M., Biron, G., Delespesse, G. & Sarfati, M. (1991). Antiproliferative effect of Interleukin-4 in B chronic lymphocytic leukemia. *J. Immunother.*, 10, 418-425.
- Macey, M. G. (1994). Immunophenotypic analysis of lymphocytes and leukemias. En: *Flow Cytometry: clinical applications*. (Eds.) Macey, M. G. Blackwell Scientific Publications. London, Edimburg, Boston. 67-115.
- Madsen, M., Johnsen, H. E., Wendel boe-Hander, P. & Christiansen, S. E. (1980). Isolation of human B and T lymphocytes by E-rosette gradient centrifugation. *J. Immunol. Methods.*, 33, 323.
- Mainou-Fowler, T., Copplestone, J. A. & Prentice, A. G. (1992). Proliferation and survival (apoptotic rate) of B chronic lymphocytic leukemia cells in culture with cytokines. *Blood*, 80, 1658, 417a.
- Mainou-Fowler, T., Craig, V. A., Copplestone, J. A., Hamon, M. D. & Prentice, A. G. (1994). Interleukin-5 increases spontaneous apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro independently of bcl-2 expression and is inhibited by IL-4. *Blood*, 84, 2297-2304.
- Markey, G. M., Alexander, H. D., Agneco, A. N. D. & al. (1986). Enumeration of absolute numbers of T lymphocyte subsets in B-chronic lymphocytic leukemia using an immunoperoxidase technique: relation to clinical stage. *Br. J. Hematol.*, 62, 257-273.
- McConkey, D. J., Aguilar-Santelises, M., Hartzell, P. & al. (1991). Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J. Immunol.*, 146, 1072-1076.
- McKenzie, A. N., Culpepper, J. A., de Waal-Malefyt, R. & al. (1993) Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 3735-3739.
- McManus, A. P., Desai, Z. R. & Lavabre-Bertrand, T. (1993). B-cell chronic lymphocytic leukemia populations respond stochastically to combinations of growth signals in vitro. *Leuk. Res.*, 17, 477-481.
- Menzel, T., Rahman, Z., White, K., Wieder, R. & Gabilove, J. (1994). Elevated intracellular levels of basic fibroblast growth factor correlate with stage of chronic lymphocytic leukemia and confer resistance to fludarabine. *Blood*, 84, 2085, 525a.
- Michalevicz, R., Porat, R., Vechoropoulos, M. & al. (1991). Restoration of in vitro hematopoiesis in B-chronic lymphocytic leukemia by antibodies to tumor necrosis factor. *Leuk. Res.*, 15, 111-120.

- Minty, A., Chalon, P., Derocq, J. M. & al. (1993). Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, 362, 248-250.
- Mita, S., Harada, N., Naomi, S. & al. (1988). Receptors for T-cell replacing factor/interleukin 5: specificity, quantitation, and its implication. *J. Exp. Med.*, 168, 863-878.
- Moberts, R., Hoogerbrugge, H., van Agthoven, T., Lowenberg, B. & Touw, I. (1989). Proliferative response of highly purified B chronic lymphocytic leukemia cells in serum free culture to interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha and beta. *Leuk. Res.*, 13, 973-980.
- Montserrat, E., Sánchez-Bisoni, J., Viñolas, N. & Rozman, C. (1986). Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia; analysis of its prognostic significance. *Br. J. Hematol.*, 62, 567-575.
- Montserrat, E., Viñolas, N., Reverter, J. C. & Rozman, C. (1988). Natural history of chronic lymphocytic leukemia: on the progression and prognosis of early clinical stages. *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 30, 359-361.
- Montserrat, E., Gomis, F., Vallespi, T. & al. (1991). Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults. *Blood*, 78, 1545-1551.
- Montserrat, E. (1992). Leucemia linfática crónica: clínica, pronóstico y terapia. En: *Leucemia Linfática Crónica B*. Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. Ediciones Universidad Salamanca. (Eds): López Borrasca A., Arocha Piñango C. L., Campos Guerra C. C., Parreira A., Paulovsky S., Ruíz Argüelles G., San Miguel J. F. pp II 304-309.
- Montserrat, E. & Rozman, C. (1993). Chronic Lymphocytic Leukemia: prognostic factors and natural history. *Baillières Clin. Hematol.*, 6, 849-865.
- Moore, J. S., Capocasale, R. J., Fox, F. E. & al. (1993). Response of CLL B cells to transforming growth factor-beta reflects biological heterogeneity. *Blood*, 82, 2275, 573a.
- Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P. & Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.*, 11, 165-190.
- Morabito, F., Prasthofer, E. F., Dunlap, N. E., Grossi, C. E. & Tilden, A. B. (1987). Expression of myelomonocytic antigens on chronic lymphocytic leukemia B cells correlates with their ability to produce interleukin 1. *Blood*, 70, 1750-1757.
- Morabito, F., Callea, V., Oliva, B. & al. (1993). Alpha 2-interferon in B-cell chronic lymphocytic leukemia: clinical response, serum cytokine levels, and immunophenotype modulation. *Leukemia*, 7, 366-371.
- Mosmann, T. R. (1994). Properties and functions of Interleukin-10. *Adv. Immunol.*, 56, 1-26.
- Muraguchi, A., Kishimoto, T., Miki, Y. & al. (1981). T cell replacing factor (TRF)-induced IgG secretion in human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J. Immunol.*, 127, 412-416.
- Muraguchi, A., Kehrl, J. H., Longo, Dan L. & al. (1985). Interleukin 2 receptors on human B cells. Implications for the role of interleukin 2 in human B cell function. *J. Exp. Med.*, 161, 181-197.
- Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B. & al. (1988). The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.*, 167, 332-344.
- Nagafuchi, H., Suzuki, N., Mizushima, Y. & Sakane, T. (1993). Constitutive expression of IL-6 receptors and their role in the excessive B cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, 151, 6525-6534.
- Nakase, K., Kita, K., Nasu, K. & al. (1994). Differential expression of interleukin 2 receptors (α and β chain) in mature lymphoid neoplasms. *Am. J. Hematol.*, 46, 179-183.
- Namen, A. E., Lupton, S. & Hjerrild, K. (1988). Stimulation of B-cell progenitors by cloned interleukin-7. *Nature*, 333, 571-573.

- Newman, R. A., Peterson, B., Davey, F. R. & al. (1993). Phenotypic markers and BCL-1 gene rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a cancer and leukemia group B study. *Blood*, 82, 1239-1246.
- Nicola, N. A. (1987). Why do hemopoietic growth factor receptors interact with each other? *Immunol. Today*, 8, 134-140.
- Nilsson, K., Larsson, L. G., Soderberg, O. & al. (1992). On the role of endogenously produced TNF-alpha and IL-6 as regulators of growth and differentiation of B-type chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 182, 271-277.
- Nordan, R. P. & Potter, M. (1986). A macrophage-derived factor required by plasmacytomas for survival and proliferation in vitro. *Science*, 233, 566-569.
- Nusslein, H. G., Dietz, A., Burger, R., Trag, T., Kalden, J. R. & Gramatzki, M. (1993). Chronic lymphocytic leukemia cells induce non-T cells to produce IgE in the presence of interleukin-4. *J. Clin. Immunol.*, 13, 397-405.
- O'Brien, S., del Giglio, A. & Keating, M. (1995). Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 85, 307-318.
- Ohtani, K., Ninomiya, H., Hasegawa, Y. & al. (1995). Clinical significance of elevated soluble interleukin-6 receptor levels in the sera of patients with plasma cell dyscrasias. *Br. J. Haematol.*, 91, 116-120.
- Okada, M., Sakaguchi, N., Yoshimura, N. & al. (1983). B cell growth factor (BCGF) and B cell differentiation factor from human T hybridomas: Two distinct kinds of BCGFs and their synergism in B cell proliferation. *J. Exp. Med.*, 157, 583-590.
- Okamura, J., Gelfand, E. W. & Letarte, M. (1982). Heterogeneity of the response of chronic lymphocytic leukemia cells to phorbol ester. *Blood*, 60, 1082-1088.
- Östlund, L., Einhorn, S., Robert, K. H., Juliusson, G. & Biberfeld, P. (1986). Chronic lymphocytic leukemia cells proliferate and differentiate following exposure to interferon in vitro. *Blood*, 67, 152-159.
- Östlund, L., Biberfeld, P., Robert, K. H., Christensson, B. & Einhorn, S. (1989_a). Induction of proliferation and blast transformation by interferon in human malignant and non-malignant lymph node B cells. *Blood*, 73, 2171-2181.
- Östlund, L., Grandér, D., Juliusson, G., Robert, K. H., Lundgren, E. & Einhorn, S. (1989_b). α -Interferon receptors in malignant B-cells from patients with chronic lymphocytic leukemia: relation to induction of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and blast transformation. *Cancer Res.*, 49, 3425-3430.
- Palutzke, M., Tabaczka, P. & Gingrich, D. (1992). CD11c expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 80, 2685.
- Panayiotidis, P., Boussiotis, V. A. & Pangalis, G. A. (1990). Immunologic findings in B-chronic lymphocytic leukemia patients treated with $\alpha 2b$ -interferon. *Leuk. Lymphoma.*, 1, 235-240.
- Panayiotidis, P., Ganeshaguru, K., Jabbar, S. A. & Hoffbrand, A. V. (1993_a). Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Br. J. Haematol.*, 85, 439-445.
- Panayiotidis, P., Ganeshaguru, K., Wilkes, S., Jabbar, S. A. & Hoffbrand, A. V. (1993_b). Apoptotic cell death in B-CLL: relation to BCL-2 α , BCL-2 β protein levels and FAS antigen expression. *Blood*, 82, 1548, 391a.
- Panayiotidis, P., Ganeshaguru, K., Foroni, L. & Hoffbrand, A. V. (1994_a). Expression and function of the FAS antigen in B-chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Br. J. Haematol.*, 87, 174, 678a.
- Panayiotidis, P., Ganeshaguru, K., Jabbar, S. A. & Hoffbrand, A. V. (1994_b). Alpha-interferon protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from apoptotic cell death in vitro. *Br. J. Haematol.*, 86, 169-173.

- Paul, W. E. & Ohara, J. (1987). B cell stimulatory factor 1/interleukin 4. *Ann. Rev. Immunol.*, 5, 429-459.
- Peng, B., Mehta, N. H., Fernandes, H., Chou, C. C. & Raveche, E. (1995). Growth inhibition of malignant CD5+B (B-1) cells by antisense IL-10 oligonucleotide. *Leuk. Res.*, 19, 159-167.
- Perri, R. T. (1986). Impaired expression of cell surface receptors for B cell growth factor by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 67, 943-948.
- Petterson, T., Metsärinne, K., Teppo, A-M. & Fyhrquist, F. (1992). Immunoreactive interleukin-6 in serum of patients with B-lymphoproliferative diseases. *J. Intern. Med.*, 232, 439-442.
- Pistoia, V., Cozzolino, F., Rubartell, A., Torcia, M., Roncella, S. & Ferrarini, M. (1986). In vitro production of interleukin 1 by normal and malignant human B lymphocytes. *J. Immunol.*, 136, 1688-1692.
- Plate, J. M. D., Gregory, S. A. & Knospe, W. H. (1992). B-chronic lymphocytic leukemia cells express the pre-B-cell growth factor, interleukin-7. *Blood*, 80, 1023, 258a.
- Plate, J. M., Knospe, W. H. & Gregory, S. A. (1993_a). Regulation of interleukin-7 expression in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 82, 788, 201a.
- Plate, J. M., Knospe, W. H., Harris, J. E. & Gregory, S. A. (1993_b). Normal and aberrant expression of cytokines in neoplastic cells from chronic lymphocytic leukemias. *Hum. Immunol.*, 36, 249-258.
- Poljak, L. J., Simaga, S., Jaksic, B. & Vitale, B. (1993). Modalities of in vitro IgM and IgG production by peripheral blood lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia patients and healthy volunteers. *Leuk. Lymphoma.*, 9, 357-364.
- Polliack, A., Rabinowitz, R., Leizerowitz, R., Keren-Zur, Y. & Schlesinger, M. (1992). Myelomonocytic antigens are rarely expressed on B lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 80, 1819, 431a.
- Prokocimer, M. & Rotter, V. (1994). Structure and function of p53 in normal and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. *Blood*, 84, 2391-2411.
- Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B. G. & al. (1993). Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG₄ and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 3730-3734.
- Punnonen, J. & de Vries, J. E. (1994). Interleukin 13 induces proliferation, Ig isotype switching, and Ig synthesis by immature human fetal B cells. *J. Immunol.*, 152, 1094-1102.
- Quesenberry, P. J. (1995). Hemopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. En: *Williams Hematology Fifth edition*. E. Beutler, M. A. Lichtman, B. S. Coller, T. J. Kipps, Eds. McGraw-Hill, Inc., 211-228.
- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P. & al. (1975). Clical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46, 219-234.
- Rai, K. R. (1987). A critical analysis of staging on CLL. En: *Chronic lymphocytic leukemia: recent progress and future directions*. R. P. Gale, K.R. Rai, Eds. New York: Alan R. Liss. 253-264.
- Rai, K. R. (1993). Progress in chronic lymphocytic leukemia: a historical perspective. *Baillières Clin. Hematol.*, 6, 757-765.
- Rambaldi, A., Bettoni, S., Rossi, V. & al. (1993). Transcriptional and post-transcriptional regulation of IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha genes in chronic lymphocytic leukemia. *Br. J. Haematol.*, 83, 204-211.
- Reittie, J. E. & Hoffbrand, A. V. (1994). Interleukin 4 inhibits proliferation and spontaneous cytokine release by chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk. Res.*, 18, 55-60.
- Renauld, J-C., Houssiau, F., Louahed, J., Vink, A., Van Snick, J. & Uyttenhove, C. (1993). Interleukin-9. *Adv. Immunol.*, 54, 79-97.

- Riley, R. S., Mahin, E. J. & Ross, W. (1993). En: *Clinical applications of Flow Cytometry*. Igaku-Shoin. New York-Tokio. Igaku Shoin Medical Publishers, Inc.
- Romagnani, S., Amadori, A., Giudizi, M. G., Biagiotti, R., Maggi, E., Ricci, M. (1978). Different mitogenic activity of soluble and insoluble staphylococcal protein A (SPA). *Immunology*, 35, 471-478.
- Rosenberg, S. A. (1994). Classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 84, 1359-1360.
- Rousset, F., García, E., Defrance, T. & al. (1992). Human and viral IL-10 are potent growth and differentiation factors for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 1890-1893.
- Rozman, C., Montserrat, E., Rodrigues-Fernández, J. M. & al. (1984). Bone marrow histological pattern -the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood*, 64, 642-648.
- Rozman, C. & Montserrat, E. (1995). Chronic lymphocytic leukemia. *N. Eng. J. Med.*, 333, 1052-1057.
- Saeland, S., Moreau, I., Duvert, V., Pandrau, D. & Banchereau, J. (1992). In vitro growth and maturation of human B-cell precursors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 182, 85-94.
- Saito, M., Yoshida, K., Hibi, M., Taga, T. & Kishimoto, T. (1992). Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp 130, and its regulated expression in vivo. *J. Immunol.*, 148, 4066-4071.
- Sarfati, M. (1993). Interleukin-4 and the two isoforms of CD23 antigen: their possible contribution to the physiopathology of chronic lymphocytic leukemia disease. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 35, 109-113.
- Schick, B. P. (1994). Hope for treatment of thrombocytopenia. *N. Engl. J. Med.*, 331, 875-876.
- Semenzato, G., Foa, R., Agostini, C. & al. (1987). High serum levels of soluble interleukin 2 receptor in patients with B chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 70, 396-400.
- Shubinsky, G., Polliack, A., Rabinowitz, R. & Schlesinger, M. (1994). Interleukin 4 modulates cell surface antigens in human B-CLL and lymphoma cells via different signal transduction pathways. *Blood*, 84, 1811, 456a.
- Smith, C. S., Parker, L. & Shearer, W. T. (1994). Cytokine regulation by Platelet-activating factor in a human B cell line. *J. Immunol.*, 153, 3997-4005.
- Smith, K. A. (1988). Interleukin-2: inception, impact and implications. *Science*, 240, 1169-1176.
- Smith, K. A. (1989). The Interleukin-2 receptor. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 5, 397-425.
- Snyers, L., Fontaine, V. & Content, J. (1989). Modulation of interleukin-6 receptors in human cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 557, 388-395.
- Snyers, L., De wit, L. & Content, J. (1990). Glucocorticoid up-regulation of high affinity interleukin 6 receptor on human epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 2838-2842.
- Solanki, D. L., McCurdy, P. R. & McDermott, R. P. (1982). Chronic lymphocytic leukemia: a monoclonal disease. *Am. J. Hematol.*, 13, 159-162.
- Sporn, M. B., Roberts, A. B. (1985). Autocrine growth factors and cancer. *Nature*, 313, 745-747.
- Srivastava, M. D., Srivastava, A. & Srivastava, B. I. (1994). Soluble interleukin-2 receptor, soluble CD8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 levels in hematologic malignancies. *Leuk. Lymphoma.*, 12, 241-251.
- Strickmans, P., Vandenplans, B., Dorval, Ch. & al. (1988). Decreased production of IL-6 by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 30, 321-323.

- Suzuki, H., Yasukawa, K., Saito, T. & al. (1991). Anti-murine interleukin-6 receptor antibody inhibits interleukin-6 effects in vivo. *Immunol. Lett.*, 30, 17-21.
- Suzuki, H., Yasukawa, K., Saito, T. & al. (1992). Anti-human interleukin-6 receptor antibody inhibits human myeloma growth in vivo. *Eur. J. Immunol.*, 22, 1989-1993.
- Taga, T., Kawanishi, Y., Hardy, R., Hirano, T. & Kishimoto, T. (1987). Receptors for B cell stimulatory factor 2. Quantitation, specificity, distribution and regulation of their expression. *J. Exp. Med.*, 166, 967-981.
- Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y. & al. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp 130. *Cell*, 58, 573-581.
- Taga, T., Hibi, M., Murakami, M. & al. (1992). Interleukin-6 receptors and signals. *Chem. Immunol.*, 51, 181-204.
- Taga, T. & Kishimoto, T. (1992). Role of a two-chain IL-6 receptor system in immune and hematopoietic cell regulation. *Critical Rev. Immunol.*, 11, 265-280.
- Takai, Y., Wong, G., Clark, S., Burakoff, S. & Herrmann, S. (1988). B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.*, 140, 508-512.
- Takeuchi, H. & Katayama, I. (1994). Interleukin 1 (IL-1 α and IL-1 β) induces differentiation/ activation of B cell-chronic lymphoid leukemia cells. *Cytokine*, 6, 243-246.
- Tanghe, A., Delforge, A., Bernier, M. & al. (1994). Apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells in presence of various agents and its modulation by interleukin-4. *Blood*, 84, 1791, 451a.
- Tassies, D., Montserrat, E., Villamor, N. & Rozman, C. (1991). CD11c positive B chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 78, 1893.
- Tefferi, A. & Phylly, R. L. (1992). A clinical update on chronic lymphocytic leukemia. II. Critical analysis of current chemotherapeutic modalities. *Mayo. Clin. Proc.*, 67, 457-461..
- Temperton, P., Masters, P. S., Scott, C. S., Barnett, D. & Reilly, J. T. (1993). Myeloid antigen expression in chronic lymphoproliferative disorders is related to antibody source and not clinical stage. *Br. J. Haematol.*, 86, 71, p136a.
- Teranishi, T., Hirano, T., Arima, N. & Onoue, K. (1982). Human helper T cell factor(s) (ThF) II. Induction of IgG production in B lymphoblastoid cell lines and identification of T cell-replacing factor (TRF)-like factor(s). *J. Immunol.*, 128, 1903-1908.
- Thoda, S., Nara, N., Murohashi, I. & Aoki, N. (1991). Establishment of an interleukin-3-dependent leukemic cell line from a patient with chronic lymphocytic leukemia in the acute phase. *Blood*, 78, 1789-1794.
- Till, K.J., Burthem, J., López, A. & Cawley, J. C. (1995). Late B cells express receptors for GM-CSF and the cytokine inhibits B-cell movement. *Br. J. Haematol.*, 89, 79, 294a.
- Tobler, A., Moser, M., Dewald, B. & al. (1993). Constitutive expression of interleukin-8 and its receptor in human myeloid and lymphoid leukemia. *Blood*, 82, 2517-2525.
- Tötterman, T. H., Nilsson, K. & Sundström, C. (1980). Phorbol ester-induced differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells. *Nature*, 288, 176-178.
- Touw, I., Dorssers, L. & Löwenberg, B. (1987). The proliferative response of B-cell chronic lymphocytic leukemia to interleukin 2: functional characterization of the interleukin 2 membrane receptors. *Blood*, 69, 1667-1673.
- Tremisi, P. J. & Bich-Thuy, L. (1991). Restoration of high immunoglobulin gene expression in chronic lymphoid leukemia: a possible application for gene therapy. *Cell. Immunol.*, 135, 326-334.

- Trentin, L., Zambello, R., Agostini, C. & al. (1993). Expression and functional role of tumor necrosis factor receptors on leukemic cells from patients with type B chronic lymphoproliferative disorders. *Blood*, 81, 752-758.
- Trentin, L., Zambello, R., Agostini, C. & al. (1994). Expression and regulation of tumor necrosis factor, interleukin-2, and hematopoietic growth factor receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 84, 4249-4256.
- Trinchieri, G. & Scott, P. (1994). The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunol. Today*, 15, 460-463.
- Tsatalas, C., Chalkia, P., Tsantali, Ch., Kakoulidis, I., Garyfallos, A. & Panayiotopoulos, S. (1994). Responsiveness to recombinant human erythropoietin of marrow erythroid progenitors (CFU-E and BFU-E) from B-Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 84, 1824, 460a.
- Tsilivakos, V., Tsapis, A., Kakolyris, S., Iliakis, P., Perraki, M. & Georgoulis, V. (1994). Characterization of interleukin 2 receptors on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 8, 1571-1578.
- Ugla, C., Aguilar-Santelises, M., Rosén, A., Mellstedt, H. & Jondal, M. (1987). Spontaneous production of interleukin 1 activity by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 70, 1851-1857.
- Van Damme, J., Opdenakker, G., Simpson, R. J. & al. (1987). Identification of the human 26-kDa protein, interferon- β 2 (IFN- β 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, 165, 914-919.
- Van Kooten, C., Rensink, I., Aarden, L. & Van Oers, R. (1992). Interleukin-4 inhibits both paracrine and autocrine tumor necrosis factor-alpha-induced proliferation of B chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 80, 1299-1306.
- Van Kooten, C., Rensink, I., Aarden, L. & Van Oers, R. (1993_a). Differentiation of purified malignant B cells induced by PMA or by activated normal T cells. *Leukemia*, 7, 1576-1584.
- Van Kooten, C., Rensink, I., Aarden, L. & Van Oers, R. (1993_b). Effect of IL-4 and IL-6 on the proliferation and differentiation of B-Chronic Lymphocytic Leukemia cells. *Leukemia*, 7, 618-624.
- Van Kooten, C., Rensink, I., Aarden, L. & Van Oers, R. (1993_c). TNF-alpha induces spreading of B-CLL via the CD11c/CD18 molecule. *Am J. Hematol.*, 44, 221-228.
- Van Kooten, C., Rensink, I., Aarden, L. & Van Oers, R. (1993_d). Cytokines and intracellular signals involved in the regulation of B-CLL proliferation. *Leuk. Lymphoma*, 12, 27-33.
- Van Snick, J., Cayphas, S., Szikora, J. P. & al. (1988). cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin-6. *Eur. J. Immunol.*, 18, 193-197.
- Van Snick, J. (1990). Interleukin-6: an Overview. *Annu. Rev. Immunol.*, 8, 253-278.
- Velkeniers, B., Vergani, P., Trouillas, J., D'Haens, J., Hooghe, R. J. & Hooghe-Peters, E. L. (1994). Expression of IL-6 mRNA in normal rat and human pituitaries and in human pituitary adenomas. *J. Histochem. Cytochem.*, 42, 67-76.
- Waage, A., Liabakk, N., Lien, E., Lamvik, J. & Espevik, T. (1992). p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 80, 2577-2583.
- Weissenbach, J., Chernajovsky, Y., Leevi, M. & al. (1980). Two interferon mRNA in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia Coli cloning studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7152-7156.
- Wognum, A. W., Van Gils, F. C. J. M. & Wagemaker, G. (1993). Flow cytometric detection of receptors for interleukin-6 on bone marrow and peripheral blood cells of humans and rhesus monkeys. *Blood*, 81, 2036-2043.
- Wood, N. C., Symons, J. A., Dickens, E. & Duff, W. (1992). In situ hybridization of IL-6 in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, 87, 183-189.

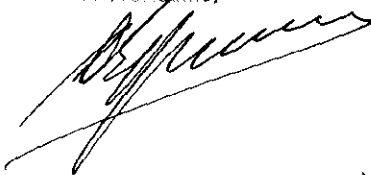
- Yagura, H., Tamaki, T. & Furitsu, T. (1990). Demonstration of high-affinity interleukin-2 receptors on B-chronic lymphocytic leukemia cells: functional and structural characterization. *Blut*, 60, 181-186.
- Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y. & al. (1988). Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN β 2) receptor. *Science*, 241, 825-828.
- Yang, Y. C. & Yin, T. (1992). Interleukin-11 and its receptor. *Biofactors*, 4, 15-21.
- Yasukawa, K., Saito, T., Fukunaga, T. & al. (1990). Purification and characterization of soluble human IL-6 receptor expressed in CHO cells. *J. Biochem.*, 108, 673-676.
- Yoshizaki, K., Matsuda, T., Nishimoto, N. & al. (1989). Pathological significance of interleukin 6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood*, 74, 1360-1367.
- Zhang, X. G., Klein, B. & Bataille, R. (1989). Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood*, 74, 11-13.
- Zhang, X. G., Gu, J. J., Lu, Z. Y. & al. (1994). Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *J. Exp. Med.*, 177, 1337-1342.
- Ziegler-Heitbrock, H. W. L., Schlag, R., Flieger, D. & Thiel, E. (1989). Favorable response of early stage B CLL patients to treatment with IFN -alpha₂. *Blood*, 73, 1426-1430.
- Zilberstein, A., Ruggieri, R., Korn, J. H. & Ravel, M. (1986). Structure and expression of cDNA and genes for human interferon- β 2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.*, 5, 2529-2537.
- Zinzani, P. L., Buzzi, M., Farabegoli, P. & al. (1994). Induction of "in vitro" apoptosis by fludarabine in freshly isolated B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk. Lymphoma.*, 13, 95-97.
- Zola, H., Neoh, S. H., Mantzioris, B. X., Webster, J. & Loughnan, M. S. (1990). Detection of immunofluorescence of surface molecules present in low copy numbers. High sensitivity staining and calibration of flow cytometer. *J. Immunol. Methods.*, 135, 247-255.
- Zupo, S., Perussia, B., Baldi, L. & al. (1992). Production of Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor but not IL-3 by normal and neoplastic human B lymphocytes. *J. Immunol.*, 148, 1423-1430.

ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LO
IL-6 COMO FACTOR AUTOCRINO EN LA LLC-B
DE LA C. AUTOP. ENRIQUE BERRIOCAL

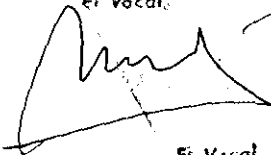
OBTUVO POR GRANDE LA CALIFICACION DE APTO CON LO QUE P R
MODIFICADA

Madrid, 12 de MARZO de 1976

El Presidente,

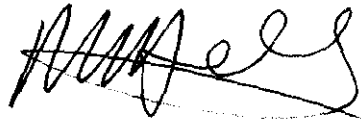


El Vocal,



El Vocal,

El vocal,



El Vocal Secretario

