

FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS Y CLÍNICOS
EN EL LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO

Tesis presentada por
Ana Ferrer del Álamo
para aspirar al grado de Doctora en Medicina

Director de la tesis: Dr. Francesc Bosch i Albareda

Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

Tutor de la tesis: Prof. Emili Montserrat i Costa

Barcelona, 2008

A mi padre, que me enseñó tanto en tan poco tiempo

A mi madre, apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida

A Pere, siempre alegría y optimismo, paciencia casi siempre

“Contar mi vida... No sé por dónde empezar. Una vida la recuerdas a saltos, a golpes. De repente te viene a la memoria un pasaje y se te ilumina la escena del recuerdo. Lo ves todo transparente, clarísimo y hasta parece que lo entiendes. Entiendes lo que está pasando allí aunque no lo entendieras cuando sucedió...

Otras veces tratas de recordar hechos que fueron importantes, acontecimientos que marcaron tu vida y no logras recrearlos, sacarlos a la superficie... Si tienes paciencia y me escuchas y luego te las arreglas para ir poniendo orden en la baraja...

Si tú te encargas de buscar explicaciones a tantas cosas que para mí están muy oscuras, entonces lo intentamos. Pero poco a poco, como me vaya saliendo. No me pidas que te cuente mi vida desde el principio y luego, todo seguido, año tras año. No hay vida que se recuerde así...”

Las Magnolias, agosto 1989

Josefina Aldecoa
Historia de una maestra

AGRADECIMIENTOS

Resumir en este espacio limitado diez años de mi vida es una tarea difícil. Por supuesto, no llevo tanto tiempo escribiendo la tesis aunque en algún momento ese tiempo se nos haya hecho eterno a todos. En este proyecto han participado muchas personas a las que quiero agradecer su esfuerzo, así que creo que lo mejor será remontarme al principio, al día en que llegué al servicio de Hematología del Hospital Clínic, e ir avanzando en el tiempo.

El primero en mi lista de agradecimientos no es la primera persona del servicio que recuerdo. Por supuesto, el primero es el Dr. Francesc Bosch, director de esta tesis, que en un lugar que ya sólo existe en el recuerdo me empezó a explicar la historia de un linfoma al que los sabios habían decidido llamar “de células del manto”. Gracias, Cesc, por enseñarme casi todo lo que sé de él, por transmitirme la urgencia de aprender, por conseguir que los pacientes de nuestra base de datos fueran miembros de mi familia, aunque yo nunca supiera su edad. Gracias por preocuparte de mí todos los viernes por la tarde durante varios años y también muchos jueves, aunque lo niegues en público. Gracias por tantos consejos y buenos ratos, y por contestar siempre a tiempo mis llamadas de S.O.S, a pesar de que, a veces, yo haya tenido la sensación de llevar horas hundida bajo el agua. Si no fuera por ti, esta tesis, seguro, no trataría del linfoma de células del manto.

Al profesor Emili Montserrat, tutor de esta tesis, le agradezco el haberme dado la oportunidad de formarme como especialista en su equipo, el transmitirme el sentimiento de grupo que, desde siempre, ha caracterizado al servicio de hematología del Clínic, y el rigor y la disciplina de trabajo puestos de manifiesto durante las sesiones diarias a las que asistí durante tantos años, primero como residente, después como becaria y finalmente como MAU.

Al profesor Elías Campo le agradezco la confianza que siempre me ha demostrado y la oportunidad de participar en sus proyectos sobre el linfoma del manto. Asistir a sus sesiones y reuniones de trabajo ha sido la mejor oportunidad de aprender y disfrutar aprendiendo. Sin duda un auténtico privilegio que constituye uno de mis mejores recuerdos de aquella etapa en el hospital Clínic.

Junio de 1997: Hematología, Hospital Clínic

Todas las personas que aparecen a continuación han tenido un papel importante en las diferentes etapas que he vivido en el Clínic. Gracias a todos ellos sigo sintiéndome en casa cuando vengo aunque ahora, eso sí, esta casa sea mi segunda residencia. Si tuviera que volver a elegir, sin ninguna duda, repetiría.

Hospitalización convencional

El Dr. Armando López-Guillermo fue el primer hematólogo clínico con el que coincidí a mi llegada al servicio. Él era el adjunto responsable de la G1B7, la antigua “UEC” de hemato, en aquella época estival en que el servicio estaba bajo mínimos. A él tengo que agradecerle tanto que no sé por dónde empezar. Gracias por todo lo que me has enseñado sobre los linfomas y sobre tantas otras cosas, por tu paciencia casi inagotable durante las horas que hemos pasado juntos (y han sido muchas...), por las risas, por las confianzas, por compartir los ratos buenos y los malos, por tu cariño constante.

Al Dr. Joan Bladé, por todo lo que me ha enseñado sobre la célula plasmática, desde mi etapa de residente en la G1B7 hasta hoy, siempre con una sonrisa y buen humor. Qué explicaciones tan apasionadas sobre La Banda Monoclonal en aquel verano de calor sofocante, al lado de un ventilador rudimentario que nos despeinaba continuamente... Gracias, Joan, por los buenos ratos viendo etapas del Tour de Francia y por tus previsiones infalibles sobre el ganador de la siguiente Vuelta. Gracias a ti sé, además, que los canarios de verdad no son amarillos y que algunos pueden tener flequillo.

El Dr. Jordi Esteve fue, durante mucho tiempo, el último adjunto en llegar al servicio. Le recuerdo haciendo casi de todo: como hematólogo de guardia, llevando el busca de interconsultas, en hospital de día de transplante, en dispensario. Siempre dispuesto a hacer cualquier cosa y a echar una mano a los demás (“servidora”). Él fue mi adjunto en la G024 en todas las etapas en las que pasé por allí; de todas ellas guardo muy buenos recuerdos e incontables trocitos de papel con esquemas y dibujos hechos a mano por el único miembro del servicio que se empeñaba en apostar por la leucemia aguda. Gracias por ser tan accesible, por tu ayuda en incontables ocasiones, por tus consejos, siempre tan válidos. Gracias por hacer de nuestro nicho

un lugar acogedor y multicultural, sede, entre otras, de interesantísimas tertulias sobre el lenguaje verbal del pingüino hembra en la Antártida.

Al Dr. Benet Nomdedeu, gracias por la ayuda prestada en tantas ocasiones, especialmente los viernes en el dispensario, por la amabilidad y el buen humor (siempre que el Barça hubiera ganado, por supuesto), por la multitud de anécdotas en las sesiones matinales y por sus insuperables melodías en el móvil.

Gracias a Carme, M^a José y Rosita, a M^a José y Anabel, a Isabel, Rosa, Nuria, Mila, M^a José, Roser, Carme, Jesús, Ana, Rosalía, Marta, Antonia, Carmen... La lista es muy larga y faltan muchas personas. Gracias a todas las secretarias, personal de enfermería y auxiliares que hacéis tan bien vuestro trabajo, facilitando el de los demás. Y gracias especialmente a todos los que conseguisteis que estar de guardia no fuese tan malo, aunque fuera domingo e hiciera sol.

Unitat d'Hematopatologia

En ella he pasado dos etapas importantes de mi vida, primero como residente y después como becaria. En el resto de periodos, durante la residencia, como MAU o incluso cuando ya no he estado en el Clínic, toda excusa ha sido buena para pasar un rato en ella. Además de aprender mucho, muchísimo, he disfrutado enormemente con el trabajo realizado allí y he tenido la suerte de conocer a personas que son de referencia en mi labor diaria.

Al Dr. Josep Lluís Aguilar le agradezco su enorme capacidad docente, puesta de manifiesto especialmente cuando los residentes pequeños llegamos al laboratorio, cargados de buenas intenciones pero extraordinariamente poco hábiles. Gracias por tu paciencia infinita al enseñarnos morfología, por tu amabilidad y delicadeza al corregirnos y por tu cariño.

A la Dra. María Rozman le agradezco igualmente todo el esfuerzo dedicado a nuestra formación. Recuerdo especialmente las horas pasadas al microscopio viendo linfocitos, describiendo linfocitos y fotografiando linfocitos, con y sin nucleolo, con y sin hendidura, con y sin pelos; su cara de resignación al tener que contar los mielogramas de pacientes con anemia normo-normo porque las preparaciones sospechosas de patología más interesante ya estaban en nuestras bandejas de

residentes, en el microscopio múltiple; y, como no, sus llamadas cantarinas al orden...”¡Ana Ferreer!”. Maru, quién me iba a decir que después de tantos años oyendo lo de “Me voy, que hoy tengo Club” yo también formaría parte de él.

Neus, mi Neus... ¡Gracias por todo! Por tu paciencia cuando, de residente, me acercaba tímidamente al citómetro y miraba las nubecitas de colores casi sin atreverme a preguntar qué eran. Por tu paciencia con las maravillosas líneas celulares y su fantástica fluorescencia, que tantas veces te obligaron a dejar tu silla para ajustar, reajustar y seguir ajustando los settings del FacsCan. Por tu paciencia con mis dudas, preguntas e inseguridades en los últimos tiempos. Pero gracias también por llenar el laboratorio a última hora de la tarde con tus conciertos de silbidos y tus óperas, por los cafés y los tés, por tus consejos, por tu prudencia, por tu compañía silenciosa. Neus, de verdad, yo de mayor quiero ser como tú.

A la Dra. Marta Aymerich le agradezco que me enseñara gran parte de lo que sé de citometría de flujo, su paciencia y su apoyo. Gracias, Marta, por el cariño que siempre me has demostrado y por los consejos en aquella época en que los residentes a punto de dejar de serlo nos encontramos, con cierta frecuencia, al borde del abismo.

A la Dra. Dolors Colomer también tengo mucho que agradecerle. Gracias por ser capaz de dividirse en trocitos y atendernos a todos los que hacíamos cola en tu despacho con nuestras dudas bajo el brazo, por ayudarme a entender el mundo de la apoptosis y por soportar, siempre con tan buen humor, el paso de una hematóloga eminentemente clínica por el mundo de los micromoles y las diluciones en leche en polvo desnatada al 5%.

Gracias a Silvia Fuentes (“Unitat d’Hematopatologia, digui’m”) por su eficiencia, por su sonrisa enmarcada por la ventanilla cada mañana durante tantos años, por su carácter, tan fuerte y tan tierno, por sus “¡Anita Ferrer!” con acento francés.

Gracias a Rosa, Montse R., Montse F., Carolina, Elena, Isabel, Aurora... Os agradezco vuestra profesionalidad y vuestra ayuda. Vosotras me enseñasteis a trabajar en un laboratorio, gracias por vuestra paciencia y vuestra amabilidad constantes.

Durante mi estancia como becaria en la Unitat d'Hematopatologia tuve la suerte de coincidir con un grupo de hábiles biólogas y ágiles farmacéuticas que, lejos de hacerme sentir el patito feo de un grupo de cisnes, extraordinariamente bien dotados para las tareas de la investigación básica, resultaron ser buenas maestras y excelentes compañeras. Gracias a Beatriz Bellosillo, Silvia Marcé y Marta Crespo ("SAM") por todo lo que me habéis enseñado, por todo lo que hemos compartido y por las patas de gallo que dentro de nada empezarán a emerger en mis párpados. Gracias a vosotras, a Raquel, a Mari y a Esther por enseñarme que trabajar en grupo con personas sin deformación médica es mucho más enriquecedor y que cerrar el laboratorio después de pasar 120 tubos por el citómetro puede ser estupendo, si se hace en compañía.

Inmunoematología, Banco de Sangre y Coagulación

De aquella época, bastante lejana en mi memoria, recuerdo especialmente a tres miembros del servicio que han contribuido a mi formación como hematóloga y como persona.

Al Dr. Arturo Pereira quiero agradecerle el tiempo dedicado, sus múltiples explicaciones, su capacidad para resumir en diez minutos lo fundamental y necesario de cualquier tema y sus preguntas con respuesta diferida.

Al Dr. Santi Maragall le debo todo lo que sé sobre el Sintron y los Sintroneros, por supuesto. Santi, gracias por compartir con nosotros el arte de ajustar los medios y los cuartos y por salpicar tus enseñanzas con tantas y tan variadas anécdotas.

Al Dr. Juan Carlos Reverter le agradezco, además de sus intentos por clarificar ese mundo oscuro que para mí han sido siempre la coagulación y la anticoagulación, su sinceridad y sus buenos consejos, así como algunas frases lapidarias que han impactado en mí hasta el punto de querer hacerlas mías.

Hospital de Día

Todos los que me conocen saben que el Dr. Francisco Cervantes fue, hasta el momento en que coincidí con él en Hospital de Día, la persona del servicio que me infundió mayor temor. Y ese miedo duró mucho, prácticamente cuatro años, porque mi rotación por Hospital de Día fue la penúltima de mi residencia. Finalmente no

hubo escapatoria y tuve que enfrentarme a ambos: a mi miedo y al Dr. Cervantes. También los que me conocen saben que hasta ahora sólo he acertado con un par de primeras impresiones y que ésta, desde luego, no fue una de ellas. Paco, gracias por enseñarme hematología, ortografía y gramática, orden y sentido común. Gracias por tu paciencia infinita y por no enfadarte nunca, ni siquiera el día en que cambiamos el protector de pantalla de tu ordenador justo antes de que llegara una visita importantísima. Gracias por ser fuente inagotable de anécdotas que forman parte de la otra historia del servicio, la de las manchas, los calcetines y los piñones.

(Ahora vendría el Dr. López-Guillermo pero como fue el primer hematólogo que cuidó de mí a mi llegada al servicio me ha parecido más oportuno situarle en una posición privilegiada en la cronología de los agradecimientos)

Gracias a Pedro, M^a del Mar, Angelines, Jaume, Carol, Nuria, María... A todos los que desde secretaría y enfermería hacéis que Hospital de Día funcione tanto y tan bien. Vuestras trincheras son el motor del servicio y los pacientes lo saben. Trabajar con vosotros ha sido una suerte, gracias por enseñarme tanto.

E024: trasplante de precursores hemopoyéticos

Gracias a los Dres. Enric Carreras, Montse Rovira, Carmen Martínez, Álvaro Urbano y Francesc Fernández por enseñarme tanto, siempre con buen humor. Los meses que pasé con vosotros fueron estupendos.

Los residentes, mayores, pequeños y *coerres*

A Silvia Montoto y Juan Carlos Hernández-Boluda, mis residentes mayores, gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado, por compartir todo lo que vosotros sabíais, por estar ahí a todas horas, por vuestra paciencia y por vuestra amistad. Con personas como vosotros el camino es fácil.

A Mireia Camós y Alberto Álvarez; coincidir con vosotros en el tiempo y en el espacio ha sido un lujo (“Mire *dixit*”). Después de tanto tiempo juntos, en la salud y en la enfermedad, en la riqueza y en la pobreza, nada ha conseguido separarnos (porque lo de Duncan Dhu y el Gran Aperitivo Fin de Residencia Francisco Cervantes Requena no cuenta, ¿verdad?). Mire, gracias por recordarme con tu manera de hacer que el espíritu *Flower Power* todavía tiene una razón de ser en este mundo. Alberto, gracias

por tu perseverancia al intentar mejorar mis conocimientos sobre escalada en roca, escalada en hielo, ciclismo, atletismo, cocina y geografía gallega. Y gracias a los dos por lograr que sea la única persona en la nación que al oír “empanada” no piense en Móstoles ni en Encarna.

A Leonor Arenillas, por la confianza que siempre me ha demostrado desde un día hablamos de Castleman. La fortuna ha querido que, años después, sigamos trabajando juntas, compartiendo esfuerzo, sonrisas y lágrimas. Gracias por tu apoyo constante y tu amistad. Y por soportar impasible los momentos más mediterráneos de mi carácter.

A todos los pequeños que, aunque hayan crecido, seguirán siéndolo. A nuestro grupo de brujas, constituido hace ya unos años y que goza de una salud de hierro: Bet Nadal, Laura Rosiñol, Marta Gómez y Deborah Abelló. Gracias por los buenos ratos, las confidencias, las risas y los “International Meigas Meetings”. Gracias a los más pequeños, algunos todavía residentes, especialmente a Rolo y a Gonzalo, que me han adoptado en los últimos tiempos como una compañera más de las tardes de trabajo en el Clínic.

“Los becarios de Elías”

A los que en su día lo fueron y a los que lo son en la actualidad. Gracias a Lluís Hernández, Silvia Beà, Magda Pinyol y Silvia Hernández porque con vuestra ayuda y vuestro trabajo p53, ATM, CHK1 y CHK2, BMI-1, CDK4 e INK4a son mucho más que letras y números. Gracias a Iti Salaverría por su paciencia al hablarme de CGH, por su optimismo y buen humor; trabajar contigo ha sido estupendo.

Noviembre de 2004: Hospital de Sant Pau

A todos los que fueron un día compañeros en St Pau, gracias por enseñarme que con vuestra enorme capacidad de trabajo y muchas ganas de hacer cosas se puede llegar a lo más alto y mantenerse. Al Dr. Javier Briones, compañero de despacho, gracias por la ayuda, los consejos, los ratos de conversación destinados a cambiar el mundo, los plannings de pabellones y pasadizos. A Rocío Parody, Toni García y Edel Martí, tantas horas compartidas en el altillo de San Rafael, gracias por vuestro inagotable buen humor, por mantener la nevera siempre llena y por los cafés en los momentos de caos (los mejores, los de Toni).

Abril de 2005: Hospital del Mar

A todos los que formáis parte del Laboratorio, gracias por vuestro trabajo, vuestro esfuerzo y vuestro cariño, por conseguir que me sintiera en casa desde el primer día. Trabajar con personas como vosotros hace que oír el despertador por la mañana no sea tan dramático.

Al Dr. Sergio Serrano le agradezco la confianza demostrada en todo momento desde que, hace ya unos cuantos años, opté por primera vez a una plaza en su servicio.

A la Dra. Soledad Woessner, gracias por todo lo que nos enseña, como hematóloga y como persona. Su asistencia a las sesiones de los martes, sus deberes y sus preguntas (de lógica aplastante y respuesta aún desconocida, en la mayoría de los casos) suponen un estímulo constante para seguir aprendiendo.

A la Dra. Lourdes Florensa, por su confianza, su paciencia, su enorme capacidad docente y las discusiones casi diarias sobre tantos y tan variados temas (sin llegar nunca a las manos).

A la Dra. Encarna Pérez-Vila, gracias por todo lo que me enseñas cada día sobre la citología y sobre la vida. Trabajar contigo y con Lourdes es enriquecedor, gratificante y divertido.

A los citogenetistas Francesc Solé, Blanca Espinet y Marta Salido; gracias por vuestra ayuda, por vuestras explicaciones y por vuestra paciencia.

A las moleculares previamente no citadas; a Gemma Navarro y Luz Martínez-Avilés, por soportar imperturbables mis idas y venidas para encargar y recoger TCR e IgH. (Por supuesto, aquí debería aparecer Bea, pero en mi recuerdo aparece bastante antes y he de ser fiel a mi memoria).

A todos los demás: a Rosa, Montse, Rosa M^a, Judit y Bea, a Carme, Erica, Mercé... gracias por ayudarme tanto desde el primer día, por vuestra confianza y vuestro buen humor, incluso en las últimas semanas, en que esta tesis ha comido consumido gran parte de mi paciencia, ya de por sí bastante escasa.

Los incondicionales, los de siempre

A Natàlia y a Cori, a Àlex y a Carlos, gracias por los cambios de planes, los fines de semana reservados, el apoyo moral, las llamadas, los mails y los mensajes. Gracias por vuestros intentos por entender qué significa la apoptosis y qué es el linfoma del manto. Gracias por comprender desde el principio que mi trabajo es parte de mí.

A Joana Ferrer, típico ejemplar de esa rara especie que son los cirujanos, compañera de fatigas desde mucho antes de que decidiéramos nuestros destinos. Gracias por los años que hemos pasado juntas, por tu ayuda y tu apoyo en tan diversas circunstancias.

A Joan Jané, por quererme tanto.

Y a lu, cuyo destino ha empezado a correr paralelo al final de esta historia...

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN. EL LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS	1
1. Origen celular	5
2. Características citológicas e histológicas	8
2.1. Histología del ganglio y otros órganos	8
2.2. Características específicas del LCM en médula ósea y sangre periférica	13
3. Características inmunofenotípicas	15
4. Alteraciones citogenéticas	18
4.1. Translocación t(11;14)(q13;q32)	18
4.2. Alteraciones citogenéticas adicionales	20
4.2.1. Deleción de 13q14	21
4.2.2. Deleción de 17p13	21
4.2.3. Deleción de 11q22-23	22
4.2.4. Deleción de 6q21	22
4.2.5. Trisomía 12	23
4.3. Otras alteraciones citogenéticas recurrentes	23
5. Características biológicas del LCM	26
5.1. El ciclo celular normal	27
5.1.1. Fases del ciclo celular	27
5.1.2. La regulación del ciclo celular: ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas	28
5.1.3. Mecanismo de acción de los complejos ciclina de fase G ₁ -CDK	30
5.1.4. Regulación de los complejos ciclina D-CDK	31

5.2.	Alteraciones relacionadas con la desregulación del ciclo en el LCM	32
5.2.1.	Sobreexpresión de <i>ciclina D1</i>	32
5.2.2.	Alteración del <i>locus INK4a/ARF</i>	37
5.2.3.	Amplificación genómica de <i>CDK4</i>	38
5.2.4.	Amplificación de <i>BMI-1</i>	39
5.3.	Los mecanismos de reparación del ADN	39
5.4.	Alteraciones relacionadas con la respuesta al daño genómico en el LCM	41
5.4.1.	Deleción de <i>ATM</i>	42
5.4.2.	Inactivación de <i>CHK1</i> y <i>CHK2</i>	43
5.4.3.	Alteración de <i>TP53</i>	44
5.5.	La apoptosis	44
5.5.1.	Aspectos generales	44
5.5.2.	Las caspasas	47
5.5.2.1.	Vías de activación	50
5.5.2.2.	Mecanismos inhibidores	52
5.5.3.	Vías de apoptosis	59
5.5.3.1.	Apoptosis inducida por receptores de muerte	59
5.5.3.2.	Apoptosis inducida por estrés celular	61
5.5.3.3.	Conexión entre las vías de muerte celular	62
5.5.4.	Las proteínas de la familia de BCL-2	65
5.5.4.1.	Mecanismos de activación	69
5.5.4.2.	Función y regulación	72
5.5.4.3.	Desregulación y oncogénesis	80
5.6.	Alteraciones de la apoptosis en el LCM	84
6.	Características clínicas	92
7.	Tratamiento	94
7.1.	Rituximab	95
7.2.	Regímenes de poliquimioterapia	95

7.2.1. R-CHOP	96
7.2.2. R-HyperCVAD	96
7.2.3. Análogos de las purinas	97
7.3. Radioinmunoterapia	98
7.4. Trasplante de progenitores hematopoyéticos	98
7.4.1. Trasplante autólogo	98
7.4.2. Trasplante alogénico	99
7.5. Nuevas modalidades terapéuticas	101
7.5.1. Bortezomib	101
7.5.2. Talidomida	102
7.5.3. Gemcitabina	102
7.5.4. Flavopiridol	102
7.5.5. Inhibidores de mTOR	103
8. Factores pronósticos	105
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	109
III. RESULTADOS	115
PRIMER TRABAJO	117
1.1. Resumen	117
1.2. <i>Activation of mitochondrial apoptotic pathway in mantle cell lymphoma: high sensitivity to mitoxantrone in cases with functional DNA-damage response genes. Oncogene, 2004 Nov 25;23(55):8941-9.</i>	119
2. SEGUNDO TRABAJO	129
2.1. Resumen	129
2.2. <i>Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. Cancer, 2007 Jun 15;109(12):2473-80.</i>	133

3. TERCER TRABAJO	141
3.1. Resumen	141
3.2. <i>Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma.</i> <i>Ann Oncol, 2007 Oct 24 (en prensa)</i>	145
IV. DISCUSIÓN	153
V. CONCLUSIONES	173
VI. BIBLIOGRAFÍA	177

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico
AIF: *apoptosis inducing factor*
APAF-1: *apoptotic protease activating factor 1*
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ATM: *ataxia-telangiectasia mutated*
ATR: *ataxia-telangiectasia and Rad3 related*
BCL-1: *B-cell leukemia/lymphoma 1*
BIR: *baculovirus IAP repeat*
CARD: *caspase recruitment domain*, dominio de reclutamiento de caspasas
CCND1: *cyclin D1 gene*, gen ciclina D1
CDK: *cyclin-dependent kinase*, quinasa dependiente de ciclinas
CGH: *comparative genomic hybridization*, hibridación genómica comparada
CHK: *cell cycle checkpoint kinase*
DD: *death domain*, dominio de muerte
DED: *death effector domain*, dominio efector de muerte
DIABLO: *direct IAP-binding protein with low PI*
ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*
FISH: *fluorescence in situ hybridization*, hibridación *in situ* con sondas fluorescentes
IAP: *inhibitor of apoptosis proteins*, proteínas inhibidoras de la apoptosis
IPI: *international prognostic index*, índice pronóstico internacional
IGH_H: segmento V_H del dominio variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas
LCM: linfoma de células del manto
LCR: líquido cefalorraquídeo
LDCG-B: linfoma difuso de células grandes B
LF: linfoma folicular
LLC: leucemia linfática crónica
LNH: linfoma no Hodgkin
LZM: linfoma de la zona marginal
MALT: *mucosa associated lymphoid tissue*, tejido linfoide asociado a mucosas
MDM2: *mouse double minute 2 homologue*
MIPI: *mantle cell lymphoma international prognostic index*
MTC: *major translocation cluster*
mTOR: *mammalian target of rapamycin*

NAIP: *neuronal apoptosis inhibitory protein*

NOD: *nucleotide-binding oligomerization domain*

pRB: proteína del gen del retinoblastoma

PCR: *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

PRAD1: *parathyroid adenomatosis 1*

RB: retinoblastoma

RC: remisión completa

RT-PCR: *reverse transcription-polymerase chain reaction*

RZF: *RING zinc finger*

SG: supervivencia global

SLP: supervivencia libre de progresión

SLPC: síndrome linfoproliferativo crónico

SMAC: *second mitochondrial activator of caspases*

SNC: sistema nervioso central

tBID: *truncated BID*, BID truncado

Ts-IAP: *testis-specific IAP*

XIAP: *X-chromosome-linked IAP*

I. INTRODUCCIÓN

EL LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS

El linfoma de células del manto (LCM) es un síndrome linfoproliferativo crónico que representa alrededor del 6% del total de linfomas no Hodgkin (LNH). Su incidencia en la población occidental es de 2-3 casos/100.000 habitantes/año. Bajo el nombre de LCM se incluyen los linfomas clasificados anteriormente como linfomas linfocíticos de diferenciación intermedia (clasificación de Rappaport) y los linfomas centrocíticos (clasificación de Kiel). En la década de los 80, Weisenburger y cols. describieron un subtipo de linfoma caracterizado por la proliferación de linfocitos pequeños en la zona del manto folicular y lo denominaron “linfoma de células del manto” (*mantle cell lymphoma*), sugiriendo que esta variedad representaba la contrapartida folicular del linfoma de diferenciación intermedia difuso.¹

La *European Task Force for Lymphoma* definió en 1994 los criterios diagnósticos del LCM.^{2,3} Ese mismo año fue considerado por primera vez una entidad diferenciada en la clasificación REAL (*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*) en base a sus características clínicas y biológicas.⁴ Desde entonces, el LCM representa un subtipo de LNH bien definido, con unas características histológicas, inmunofenotípicas, citogenéticas y moleculares propias que hacen de esta patología una entidad singular.⁵

El LCM se caracteriza por presentar la translocación $t(11;14)(q13;q32)$. Esta translocación fue descrita en la década de los 70 como una alteración citogenética poco frecuente que aparecía en algunos LNH de células B y en casos de leucemia linfática crónica (LLC). En 1984 Tsujimoto y cols. clonaron esta translocación, en la que estaba implicado el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas y una región de 11q13. El punto de ruptura en 11q23 fue denominado *MTC* (*major translocation cluster*) y la región de este cromosoma en la que supuestamente podía existir un oncogén fue designada *BCL-1* (*B-cell leukemia/lymphoma 1*).^{6,7} En 1991 Motokura y cols. clonaron el gen localizado en 11q13 a partir de células procedentes de adenomas paratiroides.⁸ Estos adenomas eran portadores de una inversión pericéntrica del cromosoma 11 [$inv(11)(p15q13)$], en la cual tenía lugar la yuxtaposición del gen *PTH* (*parathyroid hormone gene*) con un gen localizado en 11q13. Dicho gen, que fue designado *PRAD1* (*parathyroid adenomatosis 1*), codificaba una proteína cuya función era el control del ciclo celular en la fase G1. La clonación de este gen realizada posteriormente en otros laboratorios a partir de linfomas y carcinomas escamosos de cabeza y cuello confirmó que codificaba un nuevo tipo de ciclina de fase G1, que se denominó ciclina D1 (*CCND1*).⁹⁻¹¹ La ausencia de otras regiones codificantes situadas en 11q13 entre los *loci MTC* y *PRAD1/CCND1* sugirió que *BCL-1* y *CCND1* eran el mismo gen.¹⁰ Finalmente, la nomenclatura adoptada para este gen fue la de *ciclina D1* (*CCND1*).

1. ORIGEN CELULAR

El LCM se ha considerado una enfermedad derivada de linfocitos B pregerminales. Las primeras secuencias de inmunoglobulinas obtenidas de células de pacientes con LCM confirmaban esta hipótesis, al no identificar mutaciones en los genes del segmento V_H del dominio variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgV_H).¹² Sin embargo, en estudios posteriores se ha demostrado la existencia de mutaciones de los genes IgV_H en algunos casos de LCM.¹³⁻¹⁶ Este hallazgo sugeriría que los casos con mutaciones de los genes IgV_H derivarían de linfocitos B memoria postgerminales, es decir, de células tumorales que han estado en contacto con células presentadoras de antígeno del centro germinal, lugar en que los genes de las inmunoglobulinas experimentan el proceso de hipermutación somática de manera fisiológica (figura 1). Se ha postulado, asimismo, la posibilidad de que algunos casos de LCM con hipermutaciones somáticas deriven de linfocitos de la zona marginal que hayan experimentado una respuesta antigénica independiente de las células T del centro germinal o que sean portadores de hipermutaciones no dependientes de la exposición a antígenos.¹⁷

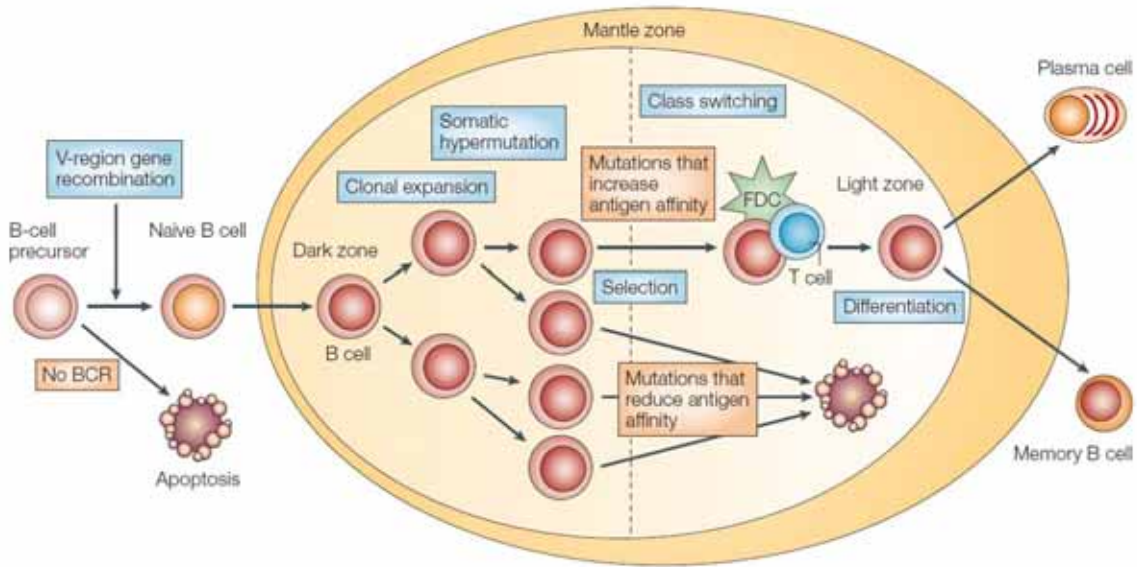


Figura 1. Diferenciación de los linfocitos B en el centro germinal. En los folículos de los órganos linfoides secundarios las células B naive forman centros germinales (CG). Estas células B naive IgM^+IgD^+ que constituyen los folículos primarios son sustituidas por los linfocitos B proliferantes del CG y desplazadas a la zona más periférica del folículo, donde forman la zona del manto folicular. En el CG se puede ver una zona oscura y otra clara; la zona oscura está constituida por células B proliferantes (centroblastos) y la clara por linfocitos en reposo (centrocitos). En las células proliferantes tiene lugar la hipermutación somática de la región IgV_H . Las mutaciones que aumentan la afinidad del receptor de células B (BCR) por el antígeno dan lugar a una selección positiva de éstas; por el contrario, las mutaciones que disminuyen esta afinidad provocan la muerte celular por apoptosis. Este proceso de selección tiene lugar en la zona clara del CG, donde los linfocitos B están en contacto con células T $CD4^+$ y células foliculares dendríticas. En los centrocitos también se produce el cambio de clase de cadena pesada de las Ig. Los centrocitos seleccionados positivamente pueden volver a entrar en el CG o abandonarlo, diferenciándose en linfocitos B memoria o células plasmáticas.

En el momento actual se considera que alrededor del 20-30% de LCM presentan hipermutaciones somáticas¹⁸⁻²¹ pero, al contrario de lo que ocurre en la LLC y el linfoma de la zona marginal (LZM), no parece existir relación

entre el estado mutacional de IgV_H y la supervivencia de los pacientes. A pesar de ello, diversos trabajos han puesto de manifiesto la existencia de un subgrupo de enfermos caracterizados por la ausencia de adenopatías periféricas (*non-nodal MCL*) que presenta un curso clínico indolente y mayor frecuencia de hipermutaciones somáticas.^{20,22} En los casos mutados se ha descrito la tendencia a utilizar determinadas familias de genes V_H (V_H3-21, V_H3-23, V_H4-34, V_H4-39 y V_H4-59), algunas de las cuales parecen asociarse a determinadas características clínico-biológicas.^{18,19,22}

2. CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS

2.1. Histología del ganglio y otros órganos

El espectro de hallazgos histológicos y citológicos en el LCM es amplio. El LCM presenta tres patrones de crecimiento característicos, posiblemente relacionados con la trama de células foliculares dendríticas subyacentes: nodular, difuso y zona del manto (*mantle zone pattern*).^{23,24} En la mayoría de casos, el LCM muestra una proliferación difusa o vagamente nodular que borra la arquitectura del ganglio linfático. Es frecuente observar áreas de transición entre los patrones nodular y difuso pero en algunos casos la nodularidad puede ser tan prominente que plantee dificultades en el diagnóstico diferencial con el linfoma folicular (LF). En el momento del diagnóstico se observa un cierto grado de nodularidad en alrededor del 20-30% de los casos. La variedad denominada “zona del manto” representa entre el 10 y el 20% de los LCM y se caracteriza por la presencia de células linfoides atípicas que producen una expansión de la zona del manto rodeando centros germinales reactivos de aspecto desnudo.¹ Una de las características histológicas del LCM es la ausencia, en general, de centroblastos y centros de proliferación.

Se ha sugerido que el patrón de crecimiento del LCM podría estar relacionado con la fase de la enfermedad. Así, el patrón de la zona del manto constituiría un estadio precoz del linfoma, mientras que el patrón difuso representaría una fase más avanzada de la enfermedad.²³ Las implicaciones

clínicas derivadas de la existencia de estos tres patrones histológicos es todavía objeto de debate. Algunos estudios sugieren que los pacientes con patrón de la zona del manto tienen un mejor pronóstico que los pacientes con LCM nodular o difuso.²⁵⁻²⁷ Sin embargo, en otros estudios no se han observado diferencias significativas en términos de supervivencia global.²⁸

Desde el punto de vista citológico se reconocen dos variantes^{24,29}: la típica o clásica y la variante blastoide. La variante típica se caracteriza por una proliferación monomorfa de linfocitos de tamaño pequeño o mediano, citoplasma escaso, contorno nuclear más o menos irregular, frecuentemente de aspecto centrocitoide, cromatina moderadamente condensada y nucleolo inconspicuo. En ocasiones el núcleo puede ser redondeado, similar al observado en la LLC (variante de célula pequeña, *CLL-like*), aunque en estos casos no suelen observarse centroblastos, parainmunoblastos ni prolinfocitos. Asimismo, las células tumorales pueden presentar un citoplasma abundante claro semejando células monocitoides; en estos casos el diagnóstico diferencial con el LZM esplénico suele resultar difícil morfológicamente. Recientemente se ha descrito la posible existencia de diferenciación plasmacítica en el LCM.^{30,31} La variante blastoide²⁵ constituye aproximadamente el 10% de los LCM y se caracteriza por la presencia de células de mayor tamaño, cromatina laxa y mayor índice proliferativo. Los LCM blastoides incluyen casos con morfología similar a la de los linfoblastos y casos constituidos por células de mayor tamaño y aspecto pleomórfico, parecidas a las observadas en los linfomas de células grandes. Algunos autores

prefieren diferenciar los tipos blástico y pleomórfico en vez de agrupar ambos bajo el nombre de blastoides. En los casos que presentan un índice proliferativo elevado suelen observarse histiocitos benignos entre las células neoplásicas, que confieren, en ocasiones, un aspecto de cielo estrellado a pequeño aumento. La variante blastoide suele presentar alteraciones genéticas adicionales. En general se considera que el LCM blastoide presenta un curso clínico más agresivo^{23-25,28,32-34} aunque en algunos estudios no se han observado diferencias significativas en términos de supervivencia entre LCM típicos y blastoides.²⁷

Las variantes morfológicas del LCM forman parte de un mismo espectro y no es, por tanto, infrecuente observar casos con características de una y otra variedad. En este sentido, se han descrito dos nuevos subtipos pleomórficos, compuestos por mezclas de células o combinaciones.²⁷ En el subtipo clásico + pleomórfico se observan dos poblaciones celulares, una de características citológicas típicas y otra pleomórfica, mientras que en el subtipo clásico/pleomórfico, las células presentan unas características de transición continua entre los tipos clásico y pleomórfico. Ambas representan tan sólo un pequeño porcentaje de LCM (1,5% del total cada subtipo) y no presentan diferencias en términos de supervivencia global.

El análisis secuencial de biopsias ha demostrado que el patrón histológico del LCM suele permanecer estable durante la evolución de la enfermedad.^{25,28,35} Sin embargo, en algunos pacientes se puede observar la

progresión de formas nodulares a difusas, e incluso se han descrito casos con patrón cambiante durante el curso evolutivo.³⁶ A pesar de ello, la progresión histológica de LCM típico a blástico es relativamente infrecuente, de tal forma que la mayoría de los LCM blásticos se presentan *de novo*. En este sentido, Norton y cols. documentaron la transformación histológica a variantes blásticas en un 17% de los casos y la presencia de células blásticas en el 70% de necropsias de pacientes diagnosticados de LCM.³⁶

La afección extraganglionar es un fenómeno frecuente en el LCM. Alrededor del 60% de pacientes con LCM presentan esplenomegalia y en determinadas ocasiones la pieza de esplenectomía constituye el único tejido disponible para establecer el diagnóstico histológico del linfoma. En estos casos, el diagnóstico diferencial con otros LNH de célula pequeña puede resultar difícil.³⁷⁻³⁹ Macroscópicamente, la infiltración esplénica por LCM se caracteriza por la presencia de múltiples nódulos, a veces de apariencia miliar. A nivel microscópico suele observarse una marcada expansión de la pulpa blanca debido a la proliferación de linfocitos atípicos de apariencia monomorfa, con infiltración variable de la pulpa roja. Aproximadamente en el 50% de los casos se encuentran centros germinales residuales de aspecto desnudo. En algunos pacientes puede observarse una zona marginal diferenciada en la periferia de los nódulos, compuesta por células con abundante citoplasma claro.^{38,40,41} Se han descrito casos ocasionales de rotura esplénica espontánea en pacientes con LCM blástico.⁴²

La afectación hepática por el LCM es frecuente y se caracteriza por la presencia de un infiltrado linfoide atípico en los espacios porta.^{23,24,43}

El tracto gastrointestinal se encuentra infiltrado en el 15-30% de pacientes afectados de LCM.^{26,28,44-48} En ocasiones se observa la formación de numerosos pólipos, en general en el tracto colónico, constituyendo la denominada poliposis linfomatoide. Si bien esta entidad fue reconocida inicialmente por Briquet en el siglo XIX, el término fue acuñado por Cornes en 1961 para describir un patrón específico de afección del tracto gastrointestinal en el cual varios segmentos de intestino se encontraban infiltrados superficialmente por nódulos o tumoraciones polipoides de aspecto blanquecino, constituidos por células linfoides atípicas.⁴⁹ Aunque el LCM es la causa más frecuente de la poliposis colónica, ésta puede ser también consecuencia de la infiltración del tracto gastrointestinal por LF o de tipo MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*), por lo que el uso de métodos adicionales puede ser necesario para establecer el diagnóstico.⁵⁰⁻⁵⁴ En este sentido, la tinción inmunohistoquímica con ciclina D1 presenta una mayor sensibilidad diagnóstica que la hibridación in situ con sondas fluorescentes (*FISH*) para la t(11;14) o el estudio de clonalidad mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*).⁵⁵

2.2. Características específicas del LCM en médula ósea y sangre periférica

La infiltración de la médula ósea tiene lugar en alrededor del 60-90% de los pacientes y se detecta con mayor frecuencia en biopsias que en aspirados medulares.⁵⁶⁻⁵⁸ El patrón infiltrativo puede ser nodular, intersticial o paratrabecular, aunque la mayoría de biopsias muestran una combinación de diversos patrones. Ocasionalmente puede observarse una infiltración medular difusa. En la mayoría de casos la morfología de las células es idéntica a la observada en los ganglios linfáticos, con ausencia de centros de proliferación y células grandes transformadas. La realización de estudios inmunofenotípicos mediante citometría de flujo o técnicas inmunohistoquímicas, incluyendo en estos casos la tinción para ciclina D1, es imprescindible para establecer el diagnóstico diferencial entre el LCM y otros síndromes linfoproliferativos crónicos B (SLPC-B) de célula pequeña.^{24,28,47} La presencia de infiltración medular en el LCM no comporta diferencias significativas en términos de supervivencia y, a diferencia de lo que ocurre en la LLC, no existe relación entre patrón de infiltración y supervivencia.

La expresión hemoperiférica en el LCM se caracteriza por la presencia de linfocitos atípicos polimorfos.^{28,59,60} En un número considerable de pacientes con LCM leucemizado no existe linfocitosis. Las células predominantes en la mayoría de casos presentan núcleo irregular, cromatina moderadamente condensada, nucleolo pequeño y citoplasma escaso. Sin

embargo, es frecuente observar células pequeñas hendidas de aspecto centrocitoide, células de morfología muy similar a las observadas en la LLC y, ocasionalmente, células de aspecto inmaduro indistinguibles de los linfoblastos. En aquellos casos en que esta última población es la predominante, la impresión diagnóstica inicial puede ser la de una leucemia aguda linfoblástica. En general la población linfoide atípica observada en sangre periférica (e igualmente en médula ósea) refleja la celularidad presente en el ganglio linfático.⁶¹ El significado pronóstico de la leucemización del LCM no está bien establecido.^{28,44,56,60,62}

3. CARACTERÍSTICAS INMUNOFENOTÍPICAS

Los linfocitos del LCM son células B maduras que expresan antígenos pan-B (CD19, CD20, CD22) e inmunoglobulinas de superficie, generalmente IgM e IgD. La cadena ligera lambda se expresa con mayor frecuencia que la cadena kappa. Las células neoplásicas son positivas, de manera característica, para el antígeno de línea T CD5, expresión que se observa en prácticamente todos los casos de LCM. De manera excepcional pueden observarse casos de LCM CD5 negativos, que se han relacionado con un curso clínico menos agresivo.⁶³ El antígeno CD43 se expresa con frecuencia. Por el contrario, el CD23 y los marcadores de centro germinal CD10 y BCL-6 son generalmente negativos.^{24,29} En el LCM se han descrito numerosos fenotipos aberrantes.⁶⁴ Las variantes fenotípicas pueden incluir, además de la negatividad para CD5, la expresión ocasional de CD23, en general de manera débil,⁶⁵ CD10, BCL-6 o los marcadores de línea T CD8⁶⁶ o CD7.⁶⁷ En todos los casos se observa expresión de la proteína BCL-2 (tabla 1).

En el estudio inmunohistoquímico, los anticuerpos frente a células foliculares dendríticas (CD21, CD35) ponen de manifiesto una malla densa e irregular de estas células en los casos de LCM con patrón de crecimiento difuso, mientras que en los casos con patrón nodular las células dendríticas se disponen formando agregados.

	CD20	IgS	CD79b	CD5	CD23	CD43	CD10	CD25	CD11c	CD103	Bcl-2
LLC	+	+	-/+	+	+	+	-	-/+	-	-	+
LCM	++	++	++	+	-	+	-	-	-	-	+
LF	++	++	++	-	-	-	+	-	-	-	++
LDCG	++	++	++	-	-	-/+	-	-	-	-	+
LELV	++	++	++	-	-	-/+	-	-/+	-/+	-/+	+
TL	++	++	++	-	-	-	-	++	++	++	+
LLP	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabla 1. Perfil inmunofenotípico de los síndromes linfoproliferativos B que pueden cursar con expresión hemoperiférica. LLC: leucemia linfática crónica; LCM: linfoma de células del manto; LF: linfoma folicular; LDCG: linfoma difuso de células grandes; LELV: linfoma esplénico con linfocitos vellosos; TL: tricoleucemia; LLP: linfoma linfoplasmocítico.

La mayoría de los LCM expresan ciclina D1, incluyendo los casos CD5 negativos. La sobreexpresión de *ciclina D1* parece ejercer un control negativo sobre la expresión del resto de ciclinas D (D2 y D3), las cuales se encuentran infraexpresadas en esta entidad. Recientemente se han descrito casos de LCM sin evidencia de t(11;14) y con negatividad para ciclina D1 que, por el contrario, sobreexpresan *ciclina D2 o D3*.^{68,69} En estos casos, la expresión de otras ciclinas diferentes a la D1 representaría una manera alternativa de acelerar la progresión del ciclo celular en ausencia de ciclina D1, a la que sustituirían funcionalmente.

En el LCM típico es constante la expresión muy débil o la negatividad de p27^{Kip1}, una proteína inhibidora de complejos ciclina-quinasa dependiente de ciclinas (CDK, *cyclin-dependent kinase*).⁷⁰ Ello contrasta con lo observado en la mayoría de LNH, en los que la expresión de p27^{Kip1} es inversamente proporcional al índice proliferativo.⁷¹ La negatividad inmunohistoquímica para p27^{Kip1} observada en el LCM típico, pese a que esta forma histológica suele presentar un índice proliferativo bajo, es debida, por un lado, a su secuestro en forma de complejos ciclina D1-CDK4 en relación a la elevada expresión de ciclina D1 y, por otro, al incremento de su degradación por los complejos ciclina E-CDK2.⁷² Por el contrario, la variante blastoide de LCM expresa niveles elevados de p27^{Kip1} a pesar de presentar un alto índice proliferativo. Se ha sugerido que la expresión elevada de p27^{Kip1} en estos casos podría ser debida a un mecanismo de retroalimentación ligado a los niveles aumentados de ciclina D1. Por otro lado, la existencia de alteraciones en otros genes reguladores del ciclo celular (*TP53*, *p16^{INK4a}* y *p21^{Waf1}*), hecho frecuente en los LCM blastoides, podría igualmente estar relacionada con la disrupción del control normal del ciclo y ocasionar un incremento compensatorio de los niveles de p27^{Kip1}.⁷⁰⁻⁷²

4. ALTERACIONES CITOGENÉTICAS

4.1. Translocación t(11;14)(q13;q32)

El LCM se caracteriza por la presencia de translocaciones cromosómicas que afectan la región 11q13, en la mayoría de casos en forma de translocación t(11;14)(q13;q32) (figura 2). Estas translocaciones ocasionan el reordenamiento y la desregulación del gen *CCND1*, cuyo resultado es la sobreexpresión de la proteína ciclina D1. La identificación de esta translocación en prácticamente todos los casos de LCM y la constante expresión de ciclina D1 en estos tumores indican su importancia en la patogénesis del LCM.

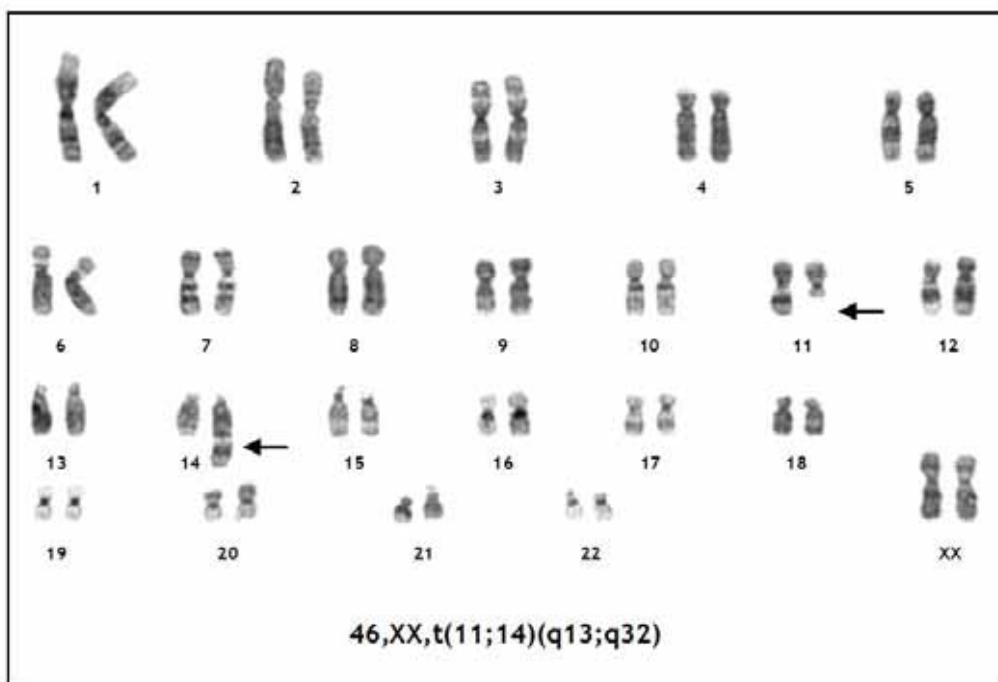


Figura 2. Translocación t(11;14)(q13;q32).

La $t(11;14)(q13;q32)$ puede detectarse mediante citogenética convencional en aproximadamente el 60-80% de los casos.⁷³⁻⁷⁵ La observación de cariotipos normales en algunos casos de LCM se debe fundamentalmente a la división de los linfocitos normales residuales. La técnica citogenética de elección para la demostración de la $t(11;14)(q13;q32)$ es la FISH, capaz de detectar la translocación en virtualmente todos los casos de LCM (figura 3). Mediante técnicas de biología molecular (*Southern blot* y, fundamentalmente, PCR) se puede detectar el reordenamiento de *BCL-1* en el punto de ruptura MTC en el 60% de casos. Empleando técnicas de alta sensibilidad (*Fiber-FISH* o *Pulse-Field Gel Electrophoresis*) se encuentra la translocación en la mayoría de casos de LCM.

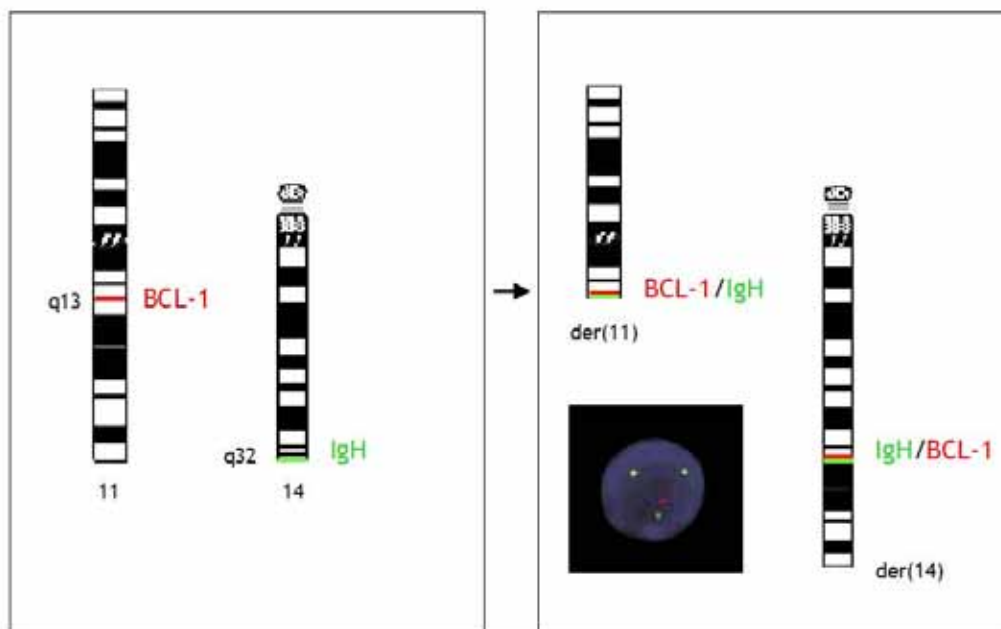


Figura 3. Detección de la $t(11;14)(q13;q32)$ mediante la técnica de FISH. En “spectrum orange” (rojo) la sonda para el oncogén *BCL-1* y en “spectrum green” (verde) la sonda para el gen de las *IgH*.

La capacidad de transformación neoplásica de *ciclina D1* se ha confirmado en diferentes estudios experimentales realizados en diversos tipos celulares. Sin embargo, los animales transgénicos para este gen no desarrollan linfomas de manera espontánea sin la cooperación de otros oncogenes, entre ellos *MYC*.⁷⁶ Ello sugiere que *ciclina D1* es menos efectiva que otros oncogenes en el proceso de linfomagénesis y que se necesitan mecanismos adicionales para el desarrollo y la progresión de los LCM.⁷⁷

4.2. Alteraciones citogenéticas adicionales

La mayoría de LCM presentan alteraciones citogenéticas adicionales a la $t(11;14)(q13;q32)$. Éstas consisten en alteraciones numéricas y estructurales e incluyen translocaciones recíprocas y no recíprocas, inversiones, isocromosomas, deleciones y cromosomas marcadores. Las alteraciones secundarias detectadas con mayor frecuencia por citogenética convencional y FISH, ambas técnicas de utilización habitual en la práctica asistencial, son las deleciones de 13q14, 17p13, 11q23 y 6q21 así como la trisomía 12. La presencia de cariotipos complejos (≥ 3 alteraciones) detectados por citogenética convencional oscila entre el 30% y el 45%.^{73,75}

4.2.1. Deleción de 13q14

La incidencia de deleción de 13q14 en el LCM oscila entre el 40-50% en algunas series^{73,78} hasta más del 70% en otras.⁷⁹ Las deleciones de 13q14 suelen ser hemicingotas. Pueden afectar a los *loci* *D13S25*, *D13S139* y *RB1*, siendo más frecuentes las deleciones de más de un *locus*, principalmente las que afectan a *D13S25* y *D13S139*. Así, la región mínima común delecionada parece ser telomérica al *locus* *RB1*. En general, la deleción de 13q14 se encuentra presente en la mayoría de células neoplásicas, lo que podría indicar su importancia en la patogenia del LCM en sus fases iniciales.⁸⁰ Recientemente se ha sugerido que los pacientes con deleciones de 13q14 tienden a presentar una supervivencia inferior y que esta alteración es un factor de mal pronóstico independiente.⁷⁸

4.2.2. Deleción de 17p13

Entre el 18 y el 40% de casos de LCM presentan deleción de 17p13 con implicación del *locus* de *TP53*.^{73,78} La mayoría de casos corresponden a deleciones hemicingotas y en general se ven afectadas $\geq 85\%$ de las células tumorales. En la mayoría de series publicadas, la deleción de 17p13 se correlaciona con una morfología blastoide y se asocia a un peor pronóstico.^{33,81,82} La presencia de esta deleción en los LCM se ha asociado, asimismo, con una mayor frecuencia de esplenomegalia y leucocitosis.^{20,78}

4.2.3. Deleción de 11q23

Las deleciones de 11q23 que afectan al *locus* de *ATM* (*ataxia-telangiectasia mutated*) se observan entre el 20% y el 50% de casos de LCM.^{78,83,84} Acostumbran a ser hemicigotas y suelen afectar a la mayoría de células neoplásicas por lo que, al igual que las deleciones de 13q14 y 17p13, se consideran acontecimientos precoces en el desarrollo del LCM⁸³⁻⁸⁵. En la mayoría de estudios las alteraciones de *ATM* no se correlacionan con un peor pronóstico,⁸⁶⁻⁸⁸ aunque se ha relacionado la existencia de deleciones de 11q23 con una afección predominantemente extraganglionar, positividad para CD38 y una tendencia a una supervivencia inferior.⁷⁸

4.2.4. Deleción de 6q21

La frecuencia de deleciones de 6q21 oscila entre el 12% y el 20%, según las distintas series.^{75,78} El porcentaje de células portadoras de esta alteración es variable. La pérdida de material a nivel de 6q podría relacionarse con el desarrollo de enfermedad extraganglionar y con un peor pronóstico.⁷⁸

4.2.5. Trisomía 12

La incidencia de trisomía 12 por citogenética convencional y FISH varía entre <10% y el 28%, según las distintas series.^{73,78} Esta alteración se observa habitualmente en alrededor del 50% de las células tumorales, lo que sugiere que sea una anomalía adquirida de manera evolutiva. La presencia de trisomía 12 total o parcial se ha relacionado con un curso clínico desfavorable.⁷³

4.3. Otras anomalías citogenéticas recurrentes

La hibridación genómica comparada (CGH) permite un análisis rápido de las alteraciones cromosómicas tumorales sin necesidad de cultivos celulares ni preparación de metafases. Esta técnica ha confirmado las alteraciones cromosómicas recurrentes descritas mediante citogenética convencional y ha permitido la identificación de anomalías no referidas previamente. Mediante CGH se ha podido determinar que la gran mayoría de casos de LCM presentan alteraciones recurrentes, siendo las más frecuentes las ganancias de los cromosomas 3q (40-70%), 6p (20%), 7p (27%), 8q (20-30%), 10p (20%), 12q (20-30%) y 18q (20%), y las pérdidas de 1p (24-33%), 6q (27-37%), 8p (20-30%), 9p (16-30%), 11q (22-30%), 17p (16-26%) y 13q (40-60%).^{83,89-92} Asimismo, se han identificado amplificaciones en diferentes regiones del genoma, fundamentalmente en 3q, 18q y Xq.^{89,90} Aunque la mayor parte de alteraciones también se han observado en otros linfomas, el

perfil global de estas anomalías y su frecuencia parecen ser característicos del LCM. El número de ganancias, pérdidas y amplificaciones es significativamente superior en las variantes blastoides de LCM, siendo más frecuentes las ganancias de 3q, 7p y 12q y las pérdidas de 17p en este subgrupo de pacientes que en los casos de LCM típico.⁹⁰

Mediante la realización de estudios moleculares se han podido correlacionar algunas anomalías observadas en los análisis de CGH con alteraciones de diferentes genes. Así, las pérdidas de 17p se asocian a alteraciones de *TP53*, cuya inactivación se produce en general por la existencia de deleciones hemicigotas y mutaciones en el otro alelo. De igual manera, las pérdidas de 9p se relacionan con deleciones de *p16^{INK4a}*, las ganancias de 12q se acompañan de amplificaciones de *CDK4* y las de 10p de amplificaciones de *BMI-1*. Por el contrario, no se han observado alteraciones de los genes *N-MYC*, *BCL-6*, *RB* ni *BCL-2* en los casos con alteraciones en 2p, 3q, 13q y 18q, respectivamente, lo que sugiere que estos genes no tendrían un papel relevante en la patogénesis del LCM.

La CGH-array ha permitido la caracterización de ganancias y pérdidas con una mayor resolución que la CGH convencional y la identificación de nuevas alteraciones cromosómicas, entre ellas ganancias de 4p12-13 y pérdidas de 2q13, 9q21-q22, 20p12.1-12.3, 20q12-13.2, 22q12.1-12.3 y 22q13.31-13.32.^{22,93-95} Asimismo, la detección de *hot spots* genómicos frecuentemente afectados ha permitido la identificación de genes candidatos

“posicionales” como *KITLG*, *GPC5* y *ING1*, que podrían desempeñar un papel fundamental en la patogénesis del LCM y de otros linfomas.⁹⁵

5. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL LINFOMA DEL MANTO

La gran mayoría de las alteraciones citogenéticas y moleculares que tienen lugar en el LCM ocasionan una alteración en la maquinaria del ciclo celular o interfieren en los mecanismos de reparación del daño producido al ADN.^{96,97} La sobreexpresión de *ciclina D1*, la amplificación genómica de la quinasa dependiente de ciclinas *CDK4*, las deleciones del inhibidor de CDK *p16^{INK4a}* y la sobreexpresión de *BMI-1*, represor de la transcripción del *locus p16^{INK4a}*, son los principales factores asociados con la desregulación de la maquinaria de ciclo celular en el LCM. Por otro lado, la vía de respuesta a daño a ADN se encuentra afectada frecuentemente por alteraciones de la quinasa ATM así como por la inactivación ocasional de las quinasas de los puntos de control CHK (*checkpoint*) 1 y CHK2, que actúan a un nivel posterior a ATM en respuesta a la detección de daño a ADN. Asimismo, el gen *TP53* se encuentra frecuentemente alterado en el LCM.

Todo ello hace del LCM un paradigma de la desregulación del ciclo y de la respuesta al daño genómico dentro de las neoplasias malignas. Los pacientes que presentan alteraciones en ambas vías tienen un peor pronóstico que aquellos que presentan disfunción de una de ellas únicamente.⁹⁸ Un estudio reciente sobre el perfil de expresión génica en pacientes diagnosticados de LCM ha definido el patrón proliferativo, una medida cuantitativa de la proliferación tumoral que integra los diferentes acontecimientos moleculares que ocurren en el LCM, como el principal factor

predictivo de supervivencia, por encima de las alteraciones oncogénicas clásicas analizadas individualmente.⁶⁹

5.1. El ciclo celular normal

5.1.1. Fases del ciclo celular

Las células estimuladas para proliferar pasan de forma cíclica a través de una serie de fases denominadas globalmente ciclo celular.⁹⁹ La proliferación celular implica la división de la célula, fenómeno precedido de la mitosis (fase M), en la que los cromosomas se condensan y organizan en el huso mitótico, que acabará segregando las cromátidas homólogas en los polos opuestos. La mitosis supone el 10% de la duración total del ciclo y al final de la misma la célula madre se ha dividido en dos células hijas con idéntica dotación cromosómica.¹⁰⁰ Entre dos mitosis consecutivas se define un periodo de tiempo (interfase) en el que se suceden, a su vez, tres fases secuenciales: G₁, S y G₂. Durante la fase S tiene lugar la duplicación del material cromosómico.¹⁰¹ Las fases G₁ y G₂ son periodos de duración variable en los que la célula se prepara para la duplicación del ADN (fase G₁) o para la mitosis (G₂). La fase G₁ es especialmente importante en cuanto a la regulación del ciclo, ya que en ella se integran los diferentes estímulos extracelulares que implican la decisión de continuar proliferando o no. En esta fase se define un periodo de tiempo cercano a la transición G₁-S denominado punto de

restricción R, a partir del cual la célula adquiere el compromiso de dividirse, entra en la fase S y progresa a lo largo del ciclo celular hasta completarlo, ya refractaria a los estímulos externos.¹⁰²

En situaciones de ausencia de factores de crecimiento, las células más diferenciadas pueden detenerse en estado diploide en el periodo G_0 del ciclo celular. Algunas de ellas podrán ser estimuladas a entrar de nuevo en ciclo y replicarse mientras otras no volverán a hacerlo nunca.

5.1.2. La regulación del ciclo celular: ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas

La progresión a través del ciclo celular resulta de la activación secuencial y ordenada de diversos elementos que juegan un papel determinante en las transiciones G_1/S y G_2/M . Esta maquinaria reguladora del ciclo celular está compuesta por dos tipos de proteínas: las ciclinas y las CDK (figura 4). Las ciclinas pueden clasificarse según su patrón de expresión y actividad en ciclinas mitóticas y ciclinas de fase G_1 . Las ciclinas A y B (B1 y B2) constituyen las denominadas ciclinas mitóticas y desarrollan su función en las fases S, G_2 y M. Así, la ciclina A es necesaria para el inicio de la síntesis del ADN y las ciclinas B controlan el paso a través de la fase M. La regulación de la transición entre las fases G_1 y S es más compleja y está regulada por las ciclinas D (D1, D2 y D3) y E,¹⁰³⁻¹⁰⁵ denominadas globalmente ciclinas de fase

G_1 . Las ciclinas D se sintetizan al inicio de la fase G_1 en respuesta a agentes externos que promueven la entrada en ciclo.¹⁰⁶ La ciclina E se expresa al final de G_1 y es necesaria para el inicio de la fase S. Las CDK son serín-treonín quinasas que se unen a las ciclinas formando complejos en los cuales la quinasa es la subunidad catalítica y la ciclina la subunidad reguladora. En mamíferos, cuatro CDK se expresan con niveles significativos y desempeñan un papel clave en la regulación del ciclo: CDK1, 2, 3 y 4. Cada CDK se asocia a una o varias ciclinas de forma específica y realiza su función en un punto concreto del ciclo celular.^{107,108}

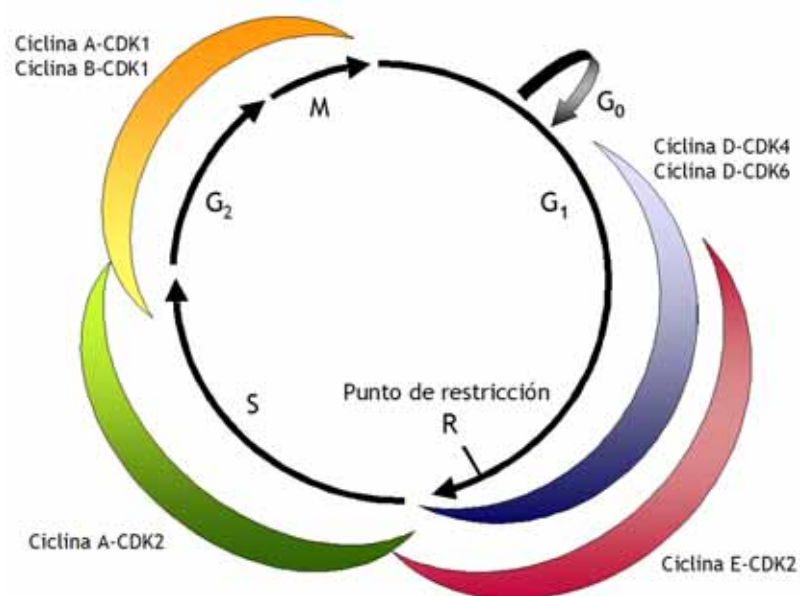


Figura 4. Actividad de los complejos ciclina-CDK durante el ciclo celular. Bajo el término “ciclina D” se engloban las ciclinas D1, D2 y D3.

5.1.3. Mecanismo de acción de los complejos ciclina de fase G₁-CDK

Uno de los principales sustratos de los complejos ciclinas de fase G₁-CDK es la proteína del gen del retinoblastoma (pRB), prototipo de gen supresor de tumores.^{109,110} pRB en su forma activa, hipofosforilada, inhibe la progresión a través del ciclo celular mediante su unión a factores de transcripción, denominados colectivamente factores E2F.¹¹¹ Estos factores de transcripción participan en la activación de genes que codifican para múltiples proteínas implicadas en la síntesis de ADN y de desoxirribonucleótidos. La fosforilación de pRb impide su asociación con E2F y permite que E2F active la transcripción de genes necesarios para la entrada de la célula en fase S.¹¹² La fosforilación de pRb es iniciada por los complejos ciclina D-CDK4/6, de manera que cuando la cantidad de pRb fosforilada es suficiente para inducir la síntesis de ciclina E y CDK2, los complejos ciclina E-CDK2 resultantes contribuyen a su vez a fosforilar a pRb. En el momento en que la cantidad de complejos ciclina E-CDK2 sobrepasa un determinado umbral, la fosforilación de pRb es capaz de continuar incluso en ausencia de factores de crecimiento y de complejos ciclina D-CDK4/6. Dado que E2F activa su propia expresión y la de ciclina E y CDK2, se produce un rápido incremento de ambas actividades al final de la fase G₂.

La acumulación de complejos ciclina-CDK mantiene en estado fosforilado a pRB durante las fases S, G₂ y M temprana. Una vez las células completan la anafase y entran en G₀ o G₁, el descenso en los niveles de estos

complejos tiene como consecuencia la defosforilación de pRb mediante la acción de fosfatasas. Como consecuencia, pRb hipofosforilada es capaz de inhibir la actividad de E2F en la fase quiescente G₀ y en la fase temprana de G₁.

5.1.4. Regulación de los complejos ciclina D-CDK

La regulación de los complejos ciclina D-CDK se produce a través de diversos mecanismos¹¹³: (i) control de la síntesis y degradación de las diferentes subunidades que forman el complejo; (ii) fosforilación y defosforilación de las CDK, mecanismo en que participa una familia de fosfatasas denominadas cdc25 (a, b y c); (iii) asociación a proteínas inhibidoras de los complejos (CKI, *CDK-inhibitory proteins*).

Las CKI se agrupan en dos familias denominadas CIP/KIP e INK4 (*inhibitors of kinase 4*), definidas en función de sus similitudes a nivel de secuencia, mecanismo de acción y especificidad de sustrato. La familia CIP/KIP está integrada por tres miembros: p21^{Waf1} 114,115, p27^{Kip1} 116 y p57^{Kip2}. 117 Estas proteínas son capaces de inhibir los complejos ciclina-CDK de fase G₁ y S de cualquier tipo y, en menor medida, las cdc. p21^{Waf1} desempeña un papel fundamental en mamíferos como mediador de p53 en la respuesta al daño genómico. La familia INK4 está constituida por cuatro miembros, p16^{INK4a} 118,119, p15^{INK4b} 120,121, p18^{INKc} 122 y p19^{INK4d} 122. Todos ellos interaccionan

únicamente con CDK4 y CDK6, por lo que controlan tan sólo la fase G₁. De este modo, al disminuir el estado de fosforilación de pRb, disminuyen la activación de la transcripción mediada por E2F y la entrada en fase S. Las alteraciones producidas en estas vías son frecuentes y desempeñan un papel clave en el desarrollo tumoral, independientemente del tipo celular en que tengan lugar.¹²³

5.2. Alteraciones relacionadas con la desregulación del ciclo celular

5.2.1. Sobreexpresión de *ciclina D1*

Como consecuencia de la translocación t(11;14)(q13;q32) el *locus BCL-1*, situado en 11q13, queda bajo el control del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas,^{6,7} dando lugar a la sobreexpresión de *ciclina D1*.^{8,124,125} El gen se transcribe fundamentalmente en dos isoformas de 4,5 y 1,5 kb; ambos transcritos contienen la región codificante completa del gen y difieren únicamente en la longitud de la región 3' no traducida (*3' untranslated region*, UTR).¹²⁶ Así, la isoforma de 4,5 kb tiene un fragmento UTR completo que incluye un segmento AUUUA con el potencial de disminuir la estabilidad del ARN mensajero (ARNm) del gen *ciclina D1*. Como consecuencia, la expresión abundante de la isoforma corta de ciclina D1 en las células de LCM se correlaciona con una mayor cantidad total de ARNm y de proteína.^{69,126,127} Recientemente se ha descrito que las isoformas cortas de ARNm de ciclina D1

son isoformas de ciclina D1a con la región 3'UTR truncada y no *splicings* alternativos de ciclina D1b, como previamente se creía. Así, las isoformas cortas representan en realidad alteraciones genómicas estructurales que corresponden a deleciones o mutaciones puntuales.¹²⁸ Algunos LCM presentan alteraciones en las secuencias genómicas de *ciclina D1* que codifican la región 3'UTR. Estos casos no expresan la isoforma de ARNm de 4,5 kb sino una de 1,7 kb u otras isoformas cortas que también carecen de 3'UTR y por tanto de su función desestabilizadora del ARNm de ciclina D1.

Ciclina D1 es una de las proteínas fundamentales en la regulación del ciclo celular mediante su unión a CDK4 y CDK6, a través de su control sobre la fase G1 y la transición entre las fases G1 y S. Los niveles elevados de ciclina D1 aceleran la transición G1-S y, por tanto, la proliferación de las células tumorales mediante dos mecanismos: por un lado, el aumento intracelular de complejos ciclina D1/CDK ocasiona la fosforilación de pRB y la pérdida de su efecto inhibitor sobre la progresión del ciclo celular^{129,130} y, por otro, los niveles elevados de complejos ciclina D1/CDK actúan sobre los inhibidores de CDK p27^{Kip1} y p21^{Waf1}, separándolos de los complejos ciclina E/CDK2. El aumento de la actividad quinasa de estos complejos ciclina E/CDK2 facilita la entrada en fase S a través de la fosforilación de pRb.¹³¹

Por todo ello, la desregulación de ciclina D1 desempeña un papel clave en la patogénesis del LCM, neutralizando el efecto inhibitor de pRb y p27^{Kip1} sobre el ciclo celular. Asimismo, los niveles de ciclina D1 parecen

correlacionar de manera directa con el índice de proliferación del LCM⁶⁹ y con un peor pronóstico.¹²⁸

- Expresión de ciclinas D en síndromes linfoproliferativos crónicos

Al contrario de lo que ocurre con la ciclina D1, cuya expresión en los SLPC se asocia siempre a la presencia de translocaciones que involucran a 11q13, la expresión de las ciclinas D2 y D3 puede observarse en linfocitos normales, líneas celulares de hemopatías mieloides y linfoides, y pacientes afectos de leucemias agudas (LA), SLPC-B y T.^{132,133} En el caso de las LA mieloides, no parece existir predilección por la sobreexpresión de ningún tipo concreto de ciclina D, al contrario que en las hemopatías linfoides. La expresión de ciclina D2 puede observarse con frecuencia en algunos SLPC-B, como en la LLC y el linfoma linfoplasmocítico, en los que la sobreexpresión de esta ciclina es prácticamente constante.¹³⁴ Por otro lado, la expresión de ciclina D2 es intensa en líneas celulares de origen T y en células de pacientes con SLPC-T, predominantemente de fenotipo maduro.¹³² La expresión de ciclina D3 es ubicua en la mayoría de SLPC-B y en los linfocitos B normales. No obstante, se encuentra disminuida en aquellos SLPC con sobreexpresión de ciclina D1 o D2, como el LCM o el mieloma múltiple, respectivamente.¹³⁵ Este patrón diferencial y selectivo de expresión de ciclinas en las hemopatías linfoides sugiere la existencia de mecanismos reguladores entre los tres tipos de ciclinas D.

- LCM ciclina D1 negativos

La expresión de ciclina D1 se ha considerado imprescindible para el diagnóstico del LCM, por lo que la existencia de los LCM ciclina D1 negativos ha sido objeto de debate durante años. La ausencia de expresión de ciclina D1 en el LCM se ha atribuido tanto a tinciones inmunohistoquímicas subóptimas como a la sensibilidad variable de los diversos métodos para detectar su expresión. Diversos grupos han revisado series de casos diagnosticados de LCM en base a criterios histológicos y fenotípicos, comparando sus características clínicas y evolutivas en base a la presencia o ausencia de ciclina D1. Así, Yatabe y cols. demostraron que el grupo de LCM con expresión de ciclina D1 presentaba un curso clínico agresivo y debía ser diferenciado del grupo con negatividad de ciclina D1, que presentaba un pronóstico mucho más favorable.¹³⁶ Este mismo grupo analizó posteriormente una serie de 151 casos de LCM, de los cuales 23 (15%) no expresaban ciclina D1.¹³⁷ El grupo con expresión de ciclina D1 presentaba una edad más avanzada al diagnóstico, mayor frecuencia de infiltración gastrointestinal e IPI (índice pronóstico internacional) desfavorable, células tumorales de tamaño superior, mayor índice mitótico y menor expresión de p27^{KIP1}. Este grupo presentaba además una supervivencia inferior a la del grupo ciclina D1 negativo (30% vs. 86% a los 5 años, respectivamente). Estos datos sugerían que ambos grupos representaban entidades diferentes y que sólo el grupo con expresión de ciclina D1 cumplía las características de los auténticos LCM. Asimismo, se proponía que la positividad para ciclina D1 fuera considerada como uno de los

criterios para el diagnóstico de LCM y, por tanto, que el término LCM se utilizara únicamente para designar aquellos casos con expresión de ciclina D1.

Rosenwald y cols. describieron posteriormente el patrón de expresión génica del LCM a partir de la identificación de una serie de genes implicados fundamentalmente en proliferación celular que se encontraban sobreexpresados en esta entidad.⁶⁹ Con ello se identificaron casos en los que no se detectaba ARNm de ciclina D1 mediante RT-PCR cuantitativa y cuya morfología y fenotipo eran indistinguibles del resto. Estos casos eran igualmente idénticos a los LCM ciclina D1 positivos en cuanto a la expresión de los 42 genes que constituían el patrón de expresión génica característica del LCM. Cabe resaltar que algunos de estos tumores expresaban niveles elevados de ciclina D3 o de ciclina D2, muy superiores a los observados en los LCM ciclina D1 positivos. Estos datos iniciales se confirmaron posteriormente en otro trabajo del mismo grupo⁶⁸, en el cual se observó sobreexpresión de ciclina D2 o D3 en 6 casos de LCM ciclina D1 negativos, dos de ellos incluidos en el estudio previo. Quedaba así establecido un nuevo subtipo de LCM, designado LCM ciclina D1 negativo, con características histológicas y expresión génica idénticas al ciclina D1 positivo y en cuya patogénesis podría desempeñar un papel fundamental la sobreexpresión de ciclina D2 o D3. En ninguno de estos casos se detectó, sin embargo, translocaciones cromosómicas o amplificaciones afectando los *loci* de *CCND2* o *CCND3*. Recientemente se han descrito dos nuevos casos de LCM ciclina D1 negativo con sobreexpresión de ciclina D2¹³⁸; uno de ellos en una paciente con

t(2;12)(p12;p13) en el que mediante FISH se observó la fusión de *IGK* con *CCND2* y el otro en un enfermo en el cual no se pudo realizar el análisis de células en metafase pero en el que se confirmó la presencia del gen de fusión *IGK-CCND2* mediante FISH.

5.2.2. Alteración del *locus INK4a/ARF*

- Deleción de $p16^{INK4a}$

Una proporción considerable de LCM agresivos presentan deleciones homocigotas del inhibidor de CDK $p16^{INK4a}$, situado en 9p21.¹³⁹⁻¹⁴² La función inhibidora de $p16^{INK4a}$ sobre CDK4 y CDK6 mantiene a pRb en su estado activo, antiproliferativo.¹⁴³ La deleción de $p16^{INK4a}$ y los niveles elevados de ciclina D1 cooperan en la aceleración de la transición G₁/S en las células de LCM al aumentar la cantidad de complejos ciclina D1-CDK activos a nivel intracelular.

- Deleción de $p14^{ARF}$

El *locus* de $p16^{INK4a}$ codifica para un segundo transcrito, $p14^{ARF}$, cuya expresión se encuentra igualmente alterada en las deleciones homocigotas del *locus INK4a/ARF*. La proteína $p14^{ARF}$ es codificada por el mismo exón 2 utilizado por $p16^{INK4a}$ pero por un exón 1 alternativo (exón 1 β en vez del exón

1 α). Aunque es posible que la disrupción selectiva de p14^{ARF} pueda potenciar por sí misma la actividad proliferativa de las células tumorales, su principal función es la de estabilizar a p53, impidiendo su degradación mediada por MDM2 (*mouse double minute 2 homologue*).¹⁴⁴

En el LCM, al igual que en otros linfomas B, las deleciones genómicas del *locus INK4a/ARF* generalmente afectan a p16^{INK4a} y a p14^{ARF}, de manera que la inactivación de este *locus* conlleva simultáneamente una alteración en la regulación del ciclo celular y la inhibición de la vía de p53.¹⁴⁵ Las deleciones de *INK4a/ARF* se observan en aproximadamente un 20% de casos de LCM⁶⁹ y la disrupción de ambas vías parece asociarse a un curso clínico más agresivo que la inactivación de la vía de p53 únicamente.^{98,146}

5.2.3. Amplificación genómica de *CDK4*

En casos de LCM blastoides agresivos se han descrito amplificaciones genómicas de *CDK4* que dan lugar a la sobreexpresión del ARNm y de la proteína CDK4.⁹⁸ Estas amplificaciones ocurren casi exclusivamente en casos de LCM sin alteraciones del *locus INK4a/ARF*, lo que sugiere que la amplificación de *CDK4* puede representar un mecanismo patogenético alternativo de disrupción del ciclo celular a nivel del punto de control de la transición entre las fases G₁ y S.

5.2.4. Amplificación de *BMI-1*

Algunos casos de LCM sin alteraciones del *locus* de $p16^{INK4a}$ presentan amplificación y sobreexpresión de *BMI-1*, un gen perteneciente al grupo Polycomb que interviene en el ciclo celular como represor de la transcripción del *locus* $p16^{INK4a}$.^{147,148} Aunque las alteraciones de este gen son poco frecuentes en el LCM, pueden desempeñar un papel fundamental en la patogénesis de un subgrupo de LCM agresivos al suponer un mecanismo alternativo a las deleciones de $p16^{INK4a}$, observadas con mayor frecuencia.

5.3. Los mecanismos de reparación del ADN

La progresión de las células a lo largo del ciclo está monitorizada de manera adicional en una serie de puntos de control (*checkpoints*). Estos mecanismos aseguran que el material genético se conserve intacto y que cada fase del ciclo se haya completado antes de que se inicie la siguiente. Entre estos puntos de control cabe destacar el ya mencionado punto R^{149,150}, situado en el último tercio de la fase G₁, en el que desempeña un papel fundamental la pRB, y varios puntos de control adicionales en los que intervienen ATM/ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3 related*), CHK1/CHK2 y p53, todas ellas proteínas supresoras de tumores.¹⁵¹⁻¹⁵³

ATR y CHK1 impiden el inicio de la mitosis en las células que no han finalizado la síntesis de ADN. La asociación de ATR con la horquilla de replicación del ADN activa su función quinasa, ocasionando la fosforilación de CHK1. A su vez, CHK1 fosforila e inactiva la fosfatasa cdc25c, incapaz así de activar a las CDK mitóticas. De esta manera, el complejo ciclina A/B-CDK1 permanece inactivo, sin posibilidad de fosforilar diversos sustratos necesarios para la entrada de la célula en mitosis. Este proceso continúa hasta que se completa la duplicación del ADN y tiene lugar el desensamblaje de la horquilla de replicación. ATR y CHK1 llevan a cabo su función en otros puntos de control de daño a ADN.

Los puntos de control de daño genómico inhiben la progresión a lo largo del ciclo celular hasta que se completa la reparación del ADN dañado. La detención del ciclo en G₁ y S previene la copia de bases dañadas y la existencia de reordenamientos cromosómicos. La detención del ciclo en G₂ permite la reparación, antes de la mitosis, de los daños producidos en la doble hélice. En situaciones de daño genómico producido, por ejemplo, por radiaciones UV, la activación de ATM produce la fosforilación de CHK2, que a su vez fosforila a la fosfatasa cdc25a, la cual es degradada por la vía del proteasoma. Al no producirse la defosforilación de CDK2 por cdc25a, CDK2 permanece inactiva sin poder formar complejos con las ciclinas E y A, de manera que la célula queda detenida en G₁ o S. Un proceso muy similar tiene lugar en respuesta al daño genómico inducido por radiaciones gamma, que implica a la vía ATR/CHK2.

La proteína p53 contribuye a la detención del ciclo celular en las células portadoras de ADN dañado. Las células con p53 funcional se detienen en G₁ y G₂ cuando son expuestas a radiaciones gamma. Aunque p53 es un factor de transcripción, en condiciones normales es muy inestable y no suele acumularse hasta niveles suficientes para activar la transcripción.¹⁵⁴ La inestabilidad de p53 es debida a la poliubiquitinización por una ubiquitin-ligasa denominada MDM2 y su posterior degradación por la vía del proteasoma. Esta rápida degradación es inhibida por ATM y probablemente ATR, que fosforilan a p53 en su lugar de unión a MDM2. Ésta y otras modificaciones de p53 en respuesta al daño genómico aumentan su capacidad de activar la transcripción de genes que participan en la reparación del ADN. Uno de estos genes codifica para p21^{Waf1}, capaz de inhibir cualquier tipo de complejo ciclina-CDK. Como consecuencia, la célula queda detenida en G1 y G2 hasta que tiene lugar la reparación del ADN dañado y los niveles de p53 y p21^{Waf1} disminuyen.¹⁵⁵ En situaciones de daño genómico masivo, p53 es capaz de inducir la expresión de genes implicados en la activación de la muerte celular por apoptosis.

5.4. Alteraciones relacionadas con la respuesta al daño genómico

La elevada frecuencia de alteraciones cromosómicas y cariotipos tetraploides observados en un subgrupo de pacientes con LCM agresivo sugiere que las alteraciones en las vías de respuesta al daño al ADN y puntos de

control mitóticos constituyen otro mecanismo fundamental en la patogénesis de esta entidad.^{33,91}

5.4.1. Deleción de *ATM*

Una de las más frecuentes alteraciones citogenéticas adicionales a la t(11;14)(q13;q32) es la deleción de 11q22-23, región en que se localiza el gen *ATM*.^{83,84,91} Entre el 40 y el 75% de casos de LCM presentan mutaciones de *ATM* que afectan fundamentalmente al dominio quinasa PI-3 (*phosphatidylinositol 3*) o dan lugar a formas truncadas de la proteína.^{86,87,156} El gen *ATM* codifica una fosfoproteín-quinasa perteneciente a la superfamilia de las PI-3 quinasas que desempeña un papel central en la respuesta al daño a ADN. Además de resultar fundamental para la activación de *TP53* tras producirse una agresión al ADN y durante el proceso de recombinación V-D-J de las inmunoglobulinas,^{157,158} *ATM* controla, asimismo, la fosforilación de genes efectores como *TP53*, *MDM2*, *BRCA1*, *CHK2* y *NBS1*.¹⁵⁹

La inactivación de *ATM* en el LCM se asocia con un elevado número de alteraciones cromosómicas, lo que sugiere que es responsable, al menos en parte, de la inestabilidad cromosómica que presentan estos tumores.⁸⁶ Por otro lado, el hecho de que las alteraciones de *ATM* se observen en las formas clásicas y blastoides de LCM con frecuencias similares y no parezcan estar relacionadas con la proliferación tumoral o con el comportamiento clínico

sugiere que dichas alteraciones pueden representar un fenómeno precoz o predisponente en estas neoplasias.⁶⁹ En este sentido, se ha descrito la mutación heterocigota de *ATM* en la línea germinal y la pérdida del alelo no mutado en las células tumorales de un paciente diagnosticado de LCM.⁸⁶

5.4.2. Inactivación de *CHK1* y *CHK2*

CHK1 y *CHK2* son dos quinasas que actúan a un nivel posterior a *ATM*, inhibiendo la progresión del ciclo celular en respuesta a la activación de *ATM* y *ATR* en situaciones de daño al ADN. Las mutaciones y la disminución de expresión de *CHK2* son muy poco frecuentes en los linfomas B aunque se han descrito en un subgrupo de LCM que presentan un número elevado de desequilibrios cromosómicos. De manera similar a lo que ocurre con *ATM*, las mutaciones de *CHK2* observadas en la línea germinal de algunos pacientes con LCM sugieren la posibilidad de que estas mutaciones sean fenómenos predisponentes para el desarrollo de este tipo de linfomas.^{160,161}

Se han descrito casos aislados de LCM que presentan disminución de expresión de la proteína *CHK1* pero hasta el momento no se han identificado mutaciones de este gen.¹⁶²

5.4.3. Alteración de *TP53*

p53 es un factor de transcripción clave que se sobreexpresa en situaciones de estrés celular e induce la detención del ciclo celular o la entrada de la célula en apoptosis.¹⁶³ La inactivación de *TP53* es un fenómeno poco frecuente en el LCM clásico con bajo índice proliferativo pero se observa en el 30% de LCM blastoides con elevado índice proliferativo, en los que se asocia a un peor pronóstico.^{81,82,88,164}

En una pequeña proporción de LCM se han detectado niveles elevados de MDM2 que pueden representar un mecanismo alternativo a la inactivación de *TP53* al inducir su degradación.⁹⁸ Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce el aumento de expresión de MDM2 no se conoce ya que no se ha observado correlación con el número de copias de ADN.

5.5. La apoptosis

5.5.1. Aspectos generales

La apoptosis es el proceso de muerte celular por el cual las células son eliminadas en respuesta a diversos estímulos. Este proceso, fundamental en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de la homeostasis, responde a estímulos fisiológicos y patológicos. Morfológicamente se caracteriza por una

serie de cambios celulares que consisten, básicamente, en una disminución del volumen celular, condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo y el citoplasma en pequeños corpúsculos rodeados de membrana (cuerpos apoptóticos). Paralelamente a los cambios en la morfología celular se producen alteraciones bioquímicas, entre las que destacan la pérdida de la asimetría en la composición de la membrana plasmática y cambios en el potencial de membrana mitocondrial.¹⁶⁵ En las fases iniciales de la apoptosis los residuos de fosfatidilserina, que en condiciones normales se localizan exclusivamente en la cara interna de la membrana celular, quedan también expuestos en la cara externa. Ésta y otras señales permiten la fagocitosis de las células apoptóticas por los macrófagos. Asimismo, tiene lugar la activación de proteasas y endonucleasas dependientes de calcio y magnesio que actúan sobre el ADN genómico, generando múltiples fragmentos de ADN de 180-200 pares de bases.

La desregulación del programa de muerte celular está implicada en numerosas patologías. La disminución de la apoptosis permite la persistencia de células con alteraciones genéticas o autorreactivas, fundamentales en el desarrollo de neoplasias y enfermedades autoinmunes, respectivamente. Por el contrario, la activación inapropiada de la apoptosis puede ser la causa o contribuir al desarrollo de diversos trastornos neurodegenerativos, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y los síndromes mielodisplásicos, entre otros.

La apoptosis es un proceso conservado durante la evolución de las especies, lo que ha permitido su caracterización a través del estudio de modelos relativamente sencillos. El modelo más utilizado para el análisis de los mecanismos de apoptosis es el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, en el cual se describieron los primeros genes esenciales para el correcto desarrollo del programa de muerte celular (*CED-3* y *CED-4*, de *cell death proteins*, proteínas de muerte celular). Estos genes codifican para las proteínas *CED-3* y *CED-4*, antagonizadas por *CED-9*, que actúa protegiendo a la célula de la activación accidental del programa de apoptosis. Estudios posteriores¹⁶⁶ pusieron de manifiesto que *CED-4* actuaría como molécula adaptadora entre la reguladora *CED-9* y la efectora de muerte celular *CED-3*. En ausencia de apoptosis *CED-9* se encuentra unida a *CED-3* y *-4*, inhibiéndolas, mientras que ante un estímulo proapoptótico se produce la disociación de *CED-9*, la activación de *CED-3* y, consecuentemente, de otras proteínas efectoras de la apoptosis.

La identificación de la proteína *CED-3* como miembro de una familia de cistein-proteasas (caspasas) supuso la primera evidencia de la implicación de éstas en la apoptosis.¹⁶⁷ *BCL-2* fue el primer homólogo de las proteínas *CED* descrito en vertebrados, es estructural y funcionalmente muy similar a *CED-9* y, por tanto, inhibidor de la apoptosis.¹⁶⁸ En la actualidad, cada uno de los genes *CED* de *C. elegans* tienen, como mínimo, un homólogo funcional en mamíferos.

El desarrollo del programa de muerte celular puede dividirse en diferentes etapas: (i) en la fase de activación, estímulos intra y extracelulares actúan sobre múltiples vías de señalización y activan la maquinaria apoptótica; (ii) en la fase de ejecución, la maquinaria apoptótica activada actúa sobre diferentes dianas celulares; (iii) finalmente, en la fase de destrucción tienen lugar los cambios morfológicos y bioquímicos propios de la muerte celular programada.

5.5.2. Las caspasas

Las caspasas (*cysteine-aspartate-proteases*) son una familia de proteasas que constituyen la maquinaria efectora de la apoptosis.¹⁶⁹ Todas ellas proteolizan sus sustratos tras residuos específicos de ácido aspártico y son asimismo activadas por proteólisis tras residuos de ácido aspártico. Se han clonado y caracterizado 14 caspasas en mamíferos, la mayoría de las cuales están implicadas en el proceso de muerte celular programada. Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos, zimógenos o proenzimas, compuestos por cuatro dominios: un dominio amino-terminal (polipéptido N-terminal o prodominio), una subunidad grande, una subunidad pequeña y una región de unión flanqueada por residuos de aspartato.¹⁷⁰ La activación de las caspasas tiene lugar a través de mecanismos de proteólisis, a consecuencia de los cuales se eliminan el prodominio y la región de unión. Posteriormente se ensamblan las subunidades grande y pequeña, formando un heterodímero que

contiene el centro activo de la caspasa (figura 5). Los estudios cristalográficos han puesto de manifiesto que las caspasas activas están formadas por dos heterodímeros que interaccionan mediante sus subunidades pequeñas, dando lugar a un tetrámero con dos centros activos. Cada centro activo está formado por secuencias de aminoácidos de las subunidades grande y pequeña, necesarias para el reconocimiento del sustrato y su procesamiento.

En los mamíferos, las caspasas se dividen en iniciadoras (*upstream*) y efectoras (*downstream*), según el momento en que actúen en la cascada proteolítica. Las caspasas iniciadoras tienen prodominios largos que contienen estructuras capaces de interaccionar con proteínas adaptadoras específicas. En estos prodominios se han descrito dos tipos de estructuras de interacción: DED (*death effector domain*) y CARD (*caspase recruitment domain*). Por el contrario, las caspasas efectoras poseen prodominios cortos. Las caspasas iniciadoras presentan especificidad para sustratos que son similares a los lugares de reconocimiento para caspasas presentes en su propia secuencia, lo que implica que tienen la capacidad de autoactivarse. Asimismo, varias procaspasas efectoras, entre ellas las procaspasas 3 y 7, presentan en su secuencia lugares óptimos para su reconocimiento por parte de las caspasas

iniciadoras.

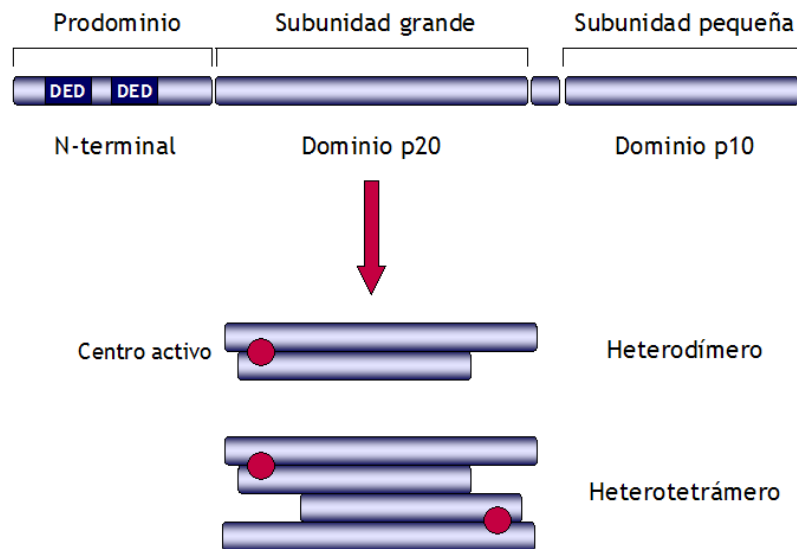


Figura 5. Estructura de las caspasas. Las caspasas son sintetizadas en forma de precursores inactivos (proenzimas o zimógenos) constituidos por un dominio de 20 kDa, otro de 10 kDa y un prodominio N-terminal denominado CARD o DED. La activación de las caspasas tiene lugar mediante proteólisis entre los dominios p20 y p10 y, generalmente, entre el prodominio y el dominio p20. Los dominios p10 y p20 forman heterodímeros. Tras experimentar cambios conformacionales queda constituido el centro activo. Las caspasas activas son tetrámeros formados por la unión de dos heterodímeros y, por tanto, tienen dos centros activos.

Una vez activas, las caspasas proteolizan numerosos sustratos intracelulares. El primer sustrato de caspasas descrito fue la PARP (poli-(ADP-ribosa)-polimerasa), utilizado desde entonces como marcador de apoptosis. La PARP se une al ADN dañado, inhibe los procesos de replicación y transcripción y permite la unión de enzimas reparadoras del ADN. La proteólisis de la PARP

tiene lugar principalmente a través de caspasa 3. En este proceso se generan dos fragmentos, uno de 85 kDa, que contiene el dominio catalítico C-terminal, y otro de 16 kDa, que contiene el dominio N-terminal de unión al ADN. Con la proteólisis de la PARP se bloquea uno de los mecanismos de reparación del ADN y se facilita la entrada de la célula en apoptosis.

La actividad caspasa es controlada a varios niveles. Por un lado, las señales proapoptóticas que activan las caspasas iniciadoras están reguladas a través de mecanismos complejos. Por otro, existen mecanismos de regulación de la degradación de las caspasas activas a través del proteasoma. Por último, la actividad enzimática de las caspasas está a su vez regulada por diversas proteínas.

5.5.2.1. Vías de activación

Se han descrito tres mecanismos fundamentales de activación de caspasas¹⁷¹ (figura 6):

- Procesamiento por caspasas iniciadoras (*upstream*): la mayoría de procaspasas efectoras se activan mediante proteólisis entre los dominios p10 y p20 y, generalmente, también entre el prodominio y p20. Esta proteólisis tiene lugar tras residuos de ácido aspártico y

resulta fundamental en la amplificación e integración de las señales proapoptóticas.

- Procesamiento inducido por proximidad: es el mecanismo que tiene lugar en la vía de los receptores de muerte para la activación de caspasa 8. La unión de numerosas moléculas de procaspasa a los receptores de muerte a través de moléculas adaptadoras produce una concentración elevada de proenzima. En esta situación, la escasa capacidad proteolítica intrínseca de caspasa 8 es suficiente para permitir la activación de varias proenzimas, que se proteolizan y activan unas a otras.
- Procesamiento por asociación a subunidades reguladoras: es el mecanismo más complejo, utilizado en la activación de procaspasa 9, que requiere la asociación de ésta a la molécula adaptadora Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) y la formación del denominado apoptosoma.¹⁷²

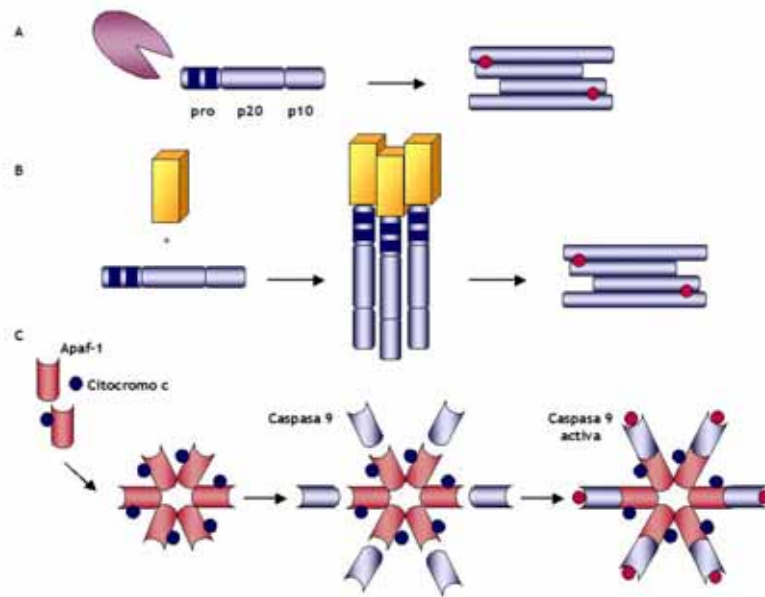


Figura 6. Mecanismos de activación de las caspasas. (A) Proteólisis por caspasas iniciadoras (*upstream*) en el caso de caspasas efectoras (*downstream*). (B) Procesamiento inducido por reclutamiento de múltiples moléculas de procaspasa 8. (C) Formación de holoenzimas. En este caso, la activación de caspasa 9 tiene lugar mediante un cambio de conformación y no por proteólisis.

5.5.2.2. Mecanismos inhibidores

- IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*)

Las IAPs son los únicos inhibidores endógenos conocidos capaces de actuar sobre caspasas iniciadoras y efectoras. Las primeras IAPs fueron identificadas en baculovirus¹⁷³ y posteriormente se describieron en *Drosophila* y numerosas especies de vertebrados. Las IAPs son fundamentalmente inhibidoras de la actividad caspasa pero también participan en la regulación

del ciclo celular y en la modulación de la transducción de señales. La primera IAP identificada en mamíferos fue NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*)¹⁷⁴; posteriormente se describieron c-IAP1, c-IAP2, XIAP (*X-chromosome-linked IAP*), survivina, livina y Ts-IAP (*testis-specific IAP*)^{175,176} (figura 7).

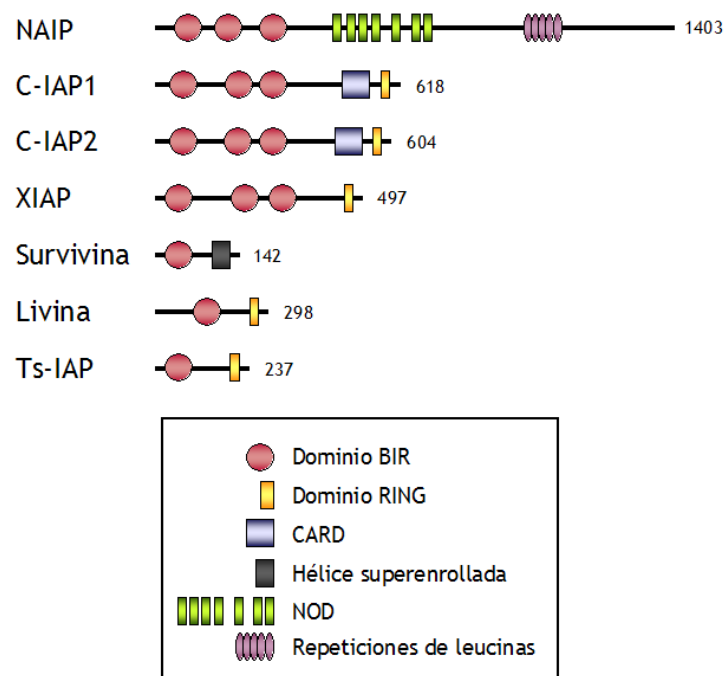


Figura 7. Estructura de los miembros de la familia de las IAP. BIR: *baculoviral IAP repeat*. CARD: *caspase recruitment domain*. RING: *RING zinc-finger*. NOD: *nucleotide-binding oligomerization domain*.

La mayoría de las interacciones de las IAPs tienen lugar a nivel de los dominios denominados BIR (*baculoviral IAP repeat*), incluida la inhibición de las caspasas (restringida a las caspasas 3, 7 y 9) aunque con afinidad

variable.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ Las IAPs presentan en su secuencia uno o varios dominios BIR, ricos en cisteína e histidina, que unen cationes de zinc. Las interacciones específicas con caspasas iniciadoras y efectoras se realizan a través de dominios BIR concretos; así, las IAPs con múltiples dominios BIR utilizan el segundo dominio para inhibir las caspasas 3 y 7, mientras que el tercero sirve de unión a caspasa 9.^{178,180} Entre las IAPs con un único dominio, Ts-IAP inhibe a caspasa 9,¹⁸¹ survivina se une a las caspasas 3 y 7¹⁸² y livina es capaz de inhibir a las caspasas 3, 7 y 9.¹⁸³ Cabe destacar que el dominio BIR1, presente en NAIP, c-IAP1, c-IAP2 y XIAP, no posee la capacidad de inhibir caspasas. Este dominio es el menos conservado de los BIR, sin que hasta el momento se conozca su función (figura 8).

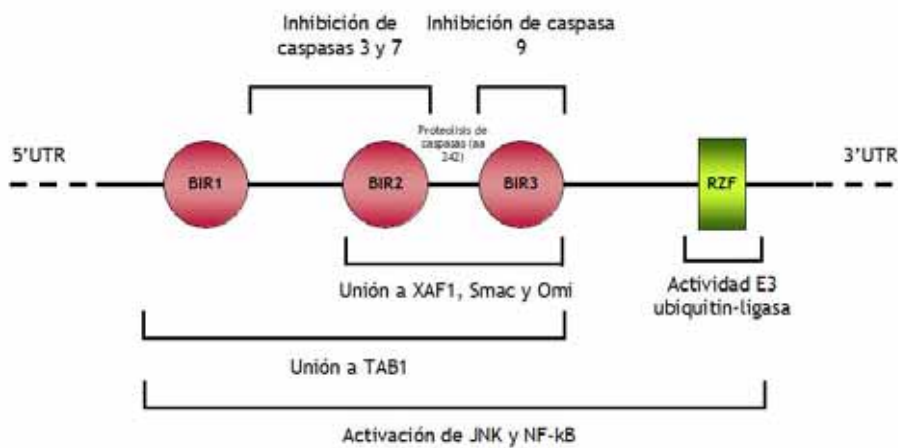


Figura 8. Mapa funcional de las actividades e interacciones de XIAP. BIR: baculoviral IAP repeat. RZF: ring zinc-finger. UTR: untranslated region.

La mayoría de las IAPs presentan además dominios RING o RZF (*ring zinc-finger*) que actúan como adaptadores, reclutando proteínas o complejos diversos, e induciendo su ubiquitinización y posterior degradación a través del proteasoma.¹⁸⁴ Así, la rápida degradación de las IAPs que tiene lugar tras el tratamiento *ex vivo* con corticoides o etopósido puede ser bloqueada con inhibidores del proteasoma.¹⁸⁵ Entre los sustratos de las IAPs que siguen esta vía de eliminación se encuentran las caspasas 3 y 7¹⁸⁶ y la proteína inhibidora de IAPs Smac (*Second mitochondrial activator of caspases*)/DIABLO (*Direct IAP-Binding Protein with Low PI*).^{187,188} En células sanas sometidas a una situación de estrés insuficiente para desencadenar la apoptosis, las caspasas activadas son inicialmente inhibidas por las IAPs (principalmente XIAP), cuya interacción provoca la autoubiquitinización de la IAP y la degradación del complejo IAP-caspasa en el proteasoma. Por el contrario, si la situación de estrés a que se ve sometida la célula es letal, las IAPs son saturadas por las interacciones con Smac y Omi, esta última también inhibidora de IAPs. La degradación de los complejos IAP-Smac e IAP-Omi ocasiona una depleción de IAPs y permite la activación no restringida de caspasas.¹⁸⁹

Algunas IAPs (c-IAP1 y c-IAP2) poseen dominios CARD que median la oligomerización con otras proteínas igualmente portadoras de CARD.¹⁹⁰ La localización de este dominio en las IAPs es poco habitual, ya que se localiza en una posición central, entre los dominios BIR y el RZF, en vez de situarse en el extremo carboxi-terminal en que se localizan casi exclusivamente el resto de dominios CARD, DD y DED (estructuralmente relacionados). Por el

momento, la función que los CARD desempeñan en c-IAP1 y c-IAP2 es desconocida.

NAIP es la única IAP que contiene un dominio de unión a nucleótidos NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) flanqueado distalmente por 14 secuencias repetidas ricas en leucina. Esta estructura, única entre las IAPs, podría estar relacionada con un posible papel de NAIP en la respuesta contra patógenos intracelulares.¹⁹¹ Así, tras la activación de caspasas pro-inflamatorias, fundamentalmente caspasa 1, la activación de NAIP bloquearía el reclutamiento de caspasas efectoras, impidiendo el desarrollo del programa de muerte celular por apoptosis.¹⁸⁹

Survivina es el único miembro de las IAPs cuya expresión tiene lugar tan sólo en la fase G2/M del ciclo celular, durante la que se localiza en íntima relación con diferentes componentes del aparato mitótico.^{192,193} De este modo, survivina desempeña una doble función al participar en la inhibición de la apoptosis y en el control de la progresión del ciclo celular, regulando la segregación de los cromosomas y la división celular. El mecanismo por el cual survivina ejerce una función antiapoptótica no se conoce con exactitud. Inicialmente se sugirió una acción directa sobre caspasa 3 pero posteriormente se demostró que survivina era incapaz de unirse a ésta.¹⁹⁴ El mecanismo alternativo podría ser la unión de survivina a caspasa 9 y/o la neutralización de la proteína inhibidora de IAPs, Smac/DIABLO, liberando de

este modo a otras IAPs que así podrían ejercer su actividad inhibidora sobre las caspasas.

Además de inhibir a las caspasas y ubiquitinar sustratos, XIAP participa en vías de transducción de señales, fundamentalmente en la activación de las vías de JNK y NF- κ B. Por otro lado, XIAP y c-IAP1 son además sustrato de las caspasas.¹⁹⁵ En la mayoría de casos, la detección de sus fragmentos proteolíticos sólo tiene lugar en células apoptóticas, por lo que la proteólisis de las IAPs parece ser un marcador de muerte celular y no un mecanismo de protección de la célula.^{196,197}

A su vez, la función de las IAPs está regulada, al menos, por tres proteínas inhibidoras (figura 9): XAF1 (XIAP-associated factor 1), Smac/DIABLO y Omi/HtrA2. XAF1, de localización nuclear, se une directamente a XIAP, predominantemente citoplasmática, e interfiere en la inhibición de ésta sobre caspasa 3.¹⁹⁸ Se ha propuesto que la expresión de XAF1 provocaría la translocación de XIAP al núcleo.¹⁹⁹ Smac y Omi son proteínas mitocondriales que son liberadas al citoplasma durante la apoptosis. Smac tiene capacidad para inhibir a todas las IAPs; en el caso concreto de XIAP, aunque Smac puede unirse tanto a BIR2 como a BIR3 y por ello interferir en la inhibición de las caspasas 3, 7 y 9, la unión más fuerte es la que tiene lugar con BIR3.^{187,200} En cuanto a Omi, su única actividad proapoptótica descrita hasta el momento es la unión directa a XIAP y la inhibición de la interacción XIAP-caspasa.^{201,202}

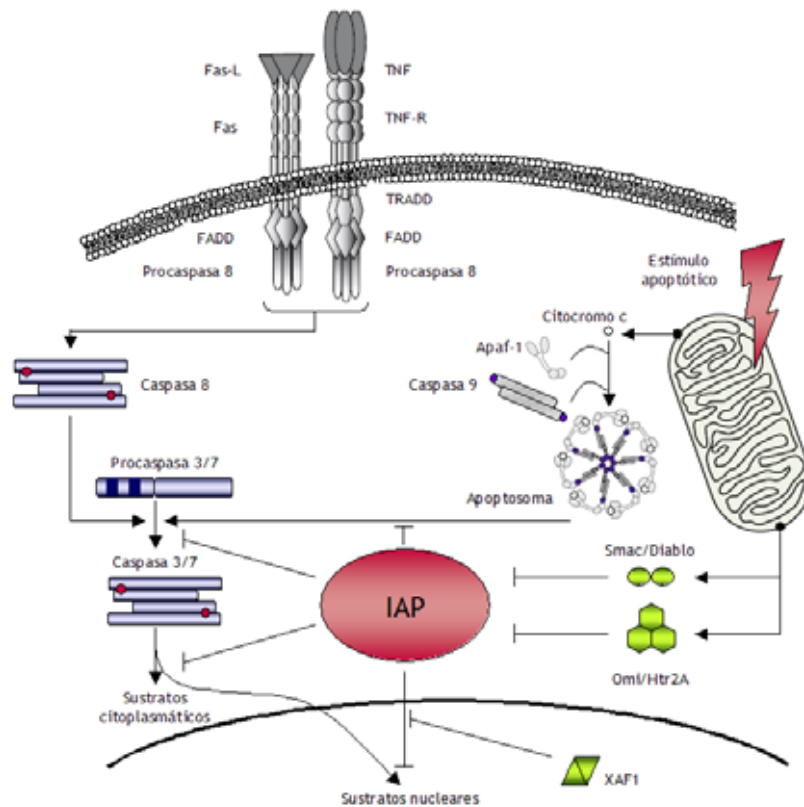


Figura 9. Papel de las IAPs en la regulación de las vías de apoptosis. Las señales de muerte celular inducen la expresión y activación de los miembros proapoptóticos de la familia de BCL-2. El balance entre proteínas pro- y antiapoptóticas constituye el primer punto de control. Si el grado de activación es suficiente, las proteínas proapoptóticas inducen la salida de citocromo c al citoplasma a través de poros en la membrana mitocondrial externa. La liberación de citocromo c desencadenará la activación de la caspasa 9 sólo en el caso de que se supere un segundo punto de control, en el cual los niveles de IAPs y de moléculas inhibitoras de éstas, principalmente XAF1, determinan el futuro de la célula. Niveles elevados de IAPs impiden la activación adicional de caspasa 9 y caspasas efectoras y participan en la eliminación de las caspasas activas a través del proteasoma mediante su actividad ubiquitin-ligasa. Por el contrario, si la cantidad de caspasa 9 activa es suficiente, se produce la activación de las caspasas 3 y 7. Asimismo, la permeabilización de la membrana mitocondrial a través de la activación del PTP (*permeability transition pore*) permite la salida de Smac/Diablo y Omi/HtrA2.

- FLIP (*FLICE/caspase 8 Inhibitory Protein*)

Posee dos regiones homólogas de dominios efectores de muerte (DED), de manera similar a las caspasas 8 y 10. Inicialmente se describió en virus tipo herpes y baculovirus (v-FLIP) y, posteriormente, en células de vertebrados²⁰³ (c-FLIP), donde se han identificado dos variantes: c-FLIP_S y c-FLIP_L. La estructura de ambos es similar a la de v-FLIP pero poseen, además, un dominio N-terminal, de mayor longitud en el caso de c-FLIP_L.

Debido a la similitud estructural existente entre caspasa 8 y FLIP, estas proteínas interfieren en la unión de caspasa 8 a su receptor, la molécula adaptadora FADD (*FAS-associated via death domain*), a través de sus dominios DED.²⁰⁴

5.5.3. Las vías de apoptosis

5.5.3.1. Apoptosis inducida por receptores de muerte

Los receptores de muerte mejor conocidos son Fas/CD95/Apo1, TNF-R y TRAIL-R. Todos ellos se caracterizan por tener dominios extracelulares similares, ricos en cisteína, y un dominio intracitoplasmático (DD, *death domain*, dominio de muerte) responsable de transducir el estímulo apoptótico.^{205,206} La unión de los receptores de muerte a ligandos

extracelulares específicos (FasL, TNF y TRAIL, respectivamente) induce el reclutamiento de la proteína adaptadora FADD y de procaspasa 8 (también de procaspasa 10), que da lugar a la formación de un complejo denominado DISC (*death-inducing signaling complex*). Este proceso tiene lugar mediante la asociación del receptor de muerte con FADD a través de sus respectivos DD (figura 10). En algunos casos esta interacción tiene lugar a través de TRADD, otra molécula que también contiene DD. La activación de procaspasa 8 requiere a su vez la interacción con FADD a través de sus DED. La agregación de dos o más moléculas de procaspasa 8, próximas entre ellas al estar unidas a FADD, probablemente sea suficiente para inducir su autoprosesamiento y activación.

La principal caspasa iniciadora en esta vía es la caspasa 8 que, al ser proteolizada, activa una cascada de caspasas, concretamente y de manera directa a la procaspasa 3, en una secuencia de hechos que culminará con la muerte de la célula.

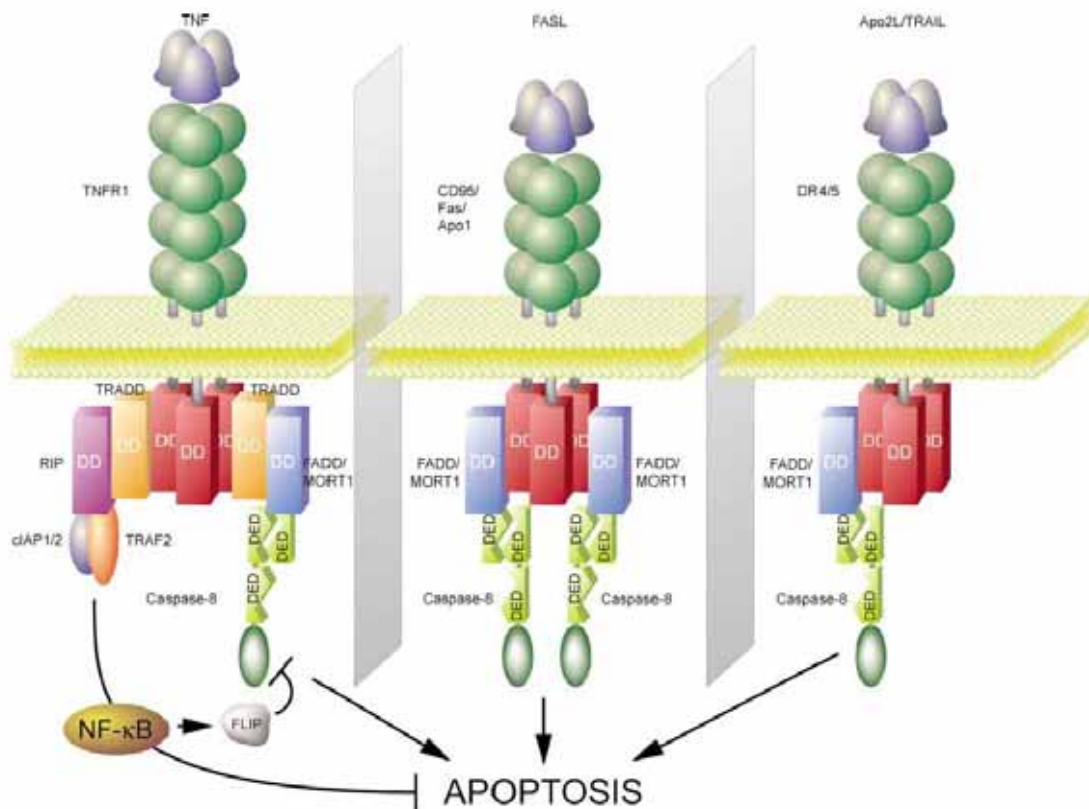


Figura 10. Vía extrínseca o de receptores de muerte. Composición de los diferentes DISC (*death-inducing signaling complex*) que se forman en la señalización de los receptores de muerte TNFR1, CD95/Fas/Apo1 y DR4/5. La unión ligando-receptor da lugar a un cambio de conformación de este último y al ensamblaje de su extremo intracitoplasmático en el complejo de señalización mediante la unión de los dominios DD. Posteriormente se produce el reclutamiento de la procaspasa 8 a través de los dominios DED. La activación de caspasa 8 en el DISC tiene lugar por autoproteólisis inducida por proximidad.

5.5.3.2. Apoptosis inducida por estrés celular

Existe una segunda vía fundamental de activación de caspasas que tiene lugar en diversas situaciones, conocidas globalmente como de estrés celular. Es la denominada vía intrínseca o mitocondrial.²⁰⁷ Esta vía se

desencadena en respuesta a una gran variedad de estímulos externos e internos, como la privación de nutrientes o de señales de supervivencia y el daño provocado al ADN por agentes quimioterápicos o radiaciones. En estas situaciones, algunas proteínas habitualmente localizadas en el espacio intermembrana mitocondrial son liberadas al citoplasma para participar en el proceso de muerte celular. Una de estas proteínas es el citocromo c, componente fundamental de la fosforilación oxidativa y de la producción de ATP en la mitocondria. Una vez en el citoplasma, el citocromo c se une a los dominios autoinhibitorios (dominios WD) de la molécula adaptadora Apaf-1, habitualmente inactiva en el citoplasma. Tras esta unión y en presencia de ATP/dATP, Apaf-1 experimenta un cambio de conformación que permite el reclutamiento de la procaspasa 9. La unión de Apaf-1 y procaspasa 9 se realiza a través de los dominios CARD. Se forma así un complejo heptamérico que incluye varias moléculas de citocromo c, Apaf-1 y procaspasa 9, denominado apoptosoma. La oligomerización de Apaf-1 a través de su dominio NOD induce la autoactivación de procaspasa 9.

5.5.3.3. Conexión entre las vías de receptores de muerte y mitocondrial

La conexión de las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis tiene lugar a través de la proteína “sólo BH3” BID, un miembro proapoptótico de la familia de BCL-2. La proteólisis de BID por caspasa 8 da lugar a su forma

activa tBID (*truncated BID*, BID truncado), dotado de una elevada actividad proapoptótica. La translocación de tBID a la mitocondria y su interacción con otros miembros de la familia de BCL-2 ocasiona la salida de citocromo c, favorece la formación del apoptosoma, la activación de la procaspasa 9 y la participación de la vía mitocondrial de apoptosis (figura 11). En la mayor parte de situaciones, la conexión entre las dos vías de muerte celular es mínima y ambas operan de manera independiente.

En función de la necesidad de que intervenga la vía intrínseca para que tenga lugar la apoptosis por activación de los receptores de muerte se pueden clasificar las células en dos tipos. En las células de tipo I, el procesamiento de caspasa 8 es suficiente para activar la cascada de caspasas; la apoptosis en estas células es independiente de la vía mitocondrial y de las proteínas de la familia de BCL-2. Por el contrario, en las células de tipo II la existencia de apoptosis en respuesta a la estimulación de los receptores de muerte depende de la translocación de tBID a la mitocondria, la salida de citocromo c y la activación de la vía intrínseca.²⁰⁸

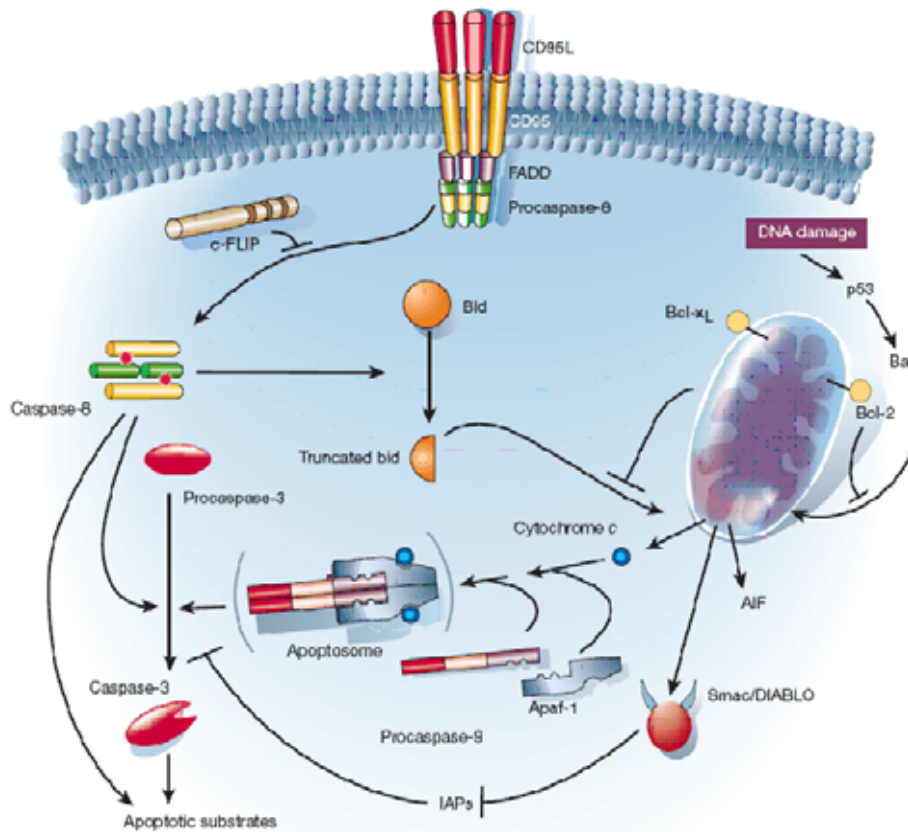


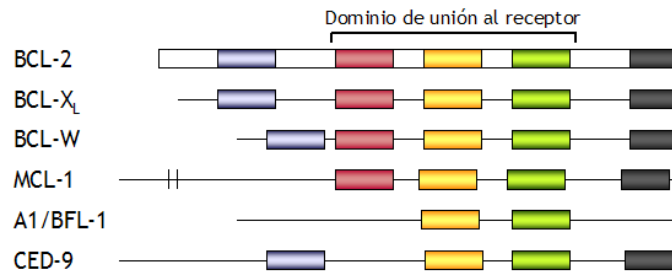
Figura 11. Vías de apoptosis. Conexión entre las vías de los receptores de muerte y mitocondrial. La vía de los receptores de muerte (a la izquierda de la figura) se inicia con la unión de miembros de esta superfamilia a sus respectivos ligandos. Esta unión induce la formación de un DISC y el reclutamiento, a través de la molécula adaptadora FADD, de múltiples moléculas de procaspasa 8, que se activan por proximidad. La activación de caspasa 8 puede ser bloqueada por diversos mecanismos, entre ellos la unión de c-FLIP. La vía mitocondrial (a la derecha) se activa en respuesta a daño celular. Diversos estímulos externos e internos convergen en la mitocondria, generalmente mediante la activación de miembros proapoptóticos de la familia de BCL-2. Tras la liberación al citoplasma de una serie de moléculas, habitualmente localizadas en el interior de la mitocondria, tiene lugar la asociación de Apaf-1, procaspasa 9 y citocromo c, que da lugar a la formación del apoptosoma. Ambas vías de muerte convergen a nivel de la activación de caspasa 3. La actividad de caspasa 3 puede ser inhibida por las IAPs, que a su vez son antagonizadas por Smac/DIABLO. La conexión entre las vías extrínseca e intrínseca tiene lugar a través de BID, miembro proapoptótico de la familia de BCL-2, cuya proteólisis por caspasa 8 da lugar a su forma activa, truncada, capaz de translocar a la mitocondria y promover la salida de citocromo c.

5.5.4. Las proteínas de la familia de BCL-2

Los miembros de la superfamilia de BCL-2 son los principales reguladores de la vía mitocondrial de apoptosis. En mamíferos esta familia se encuentra constituida, al menos, por 17 miembros capaces de integrar señales intra y extracelulares y de determinar, en función de éstas, si la célula debe activar la vía mitocondrial de muerte.^{209,210} Las diferentes proteínas de la familia de BCL-2 pueden clasificarse en tres subfamilias, que interaccionan entre ellas de diversos modos (figura 12): (i) los miembros antiapoptóticos (BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1 y A1 en humanos) protegen la célula ante situaciones de citotoxicidad. Por el contrario, las otras dos subfamilias, cuyos miembros se han identificado en su mayoría como proteínas de unión a BCL-2 (*BCL-2 binding proteins*), favorecen la apoptosis; (ii) la primera subfamilia proapoptótica incluye a BAX, BAK y BOK, proteínas caracterizadas por presentar una estructura muy similar a BCL-2,^{211,212} principalmente en tres regiones denominadas BH1, BH2 y BH3 (*BCL-2 homology regions*); (iii) la segunda subfamilia proapoptótica, constituida por proteínas que sólo contienen el dominio BH3 (*BH3-only proteins*, proteínas “sólo BH3”), incluye al menos 8 miembros: BIK, BAD, BIM, BID, BMF, HRK, NOXA y PUMA. Estas proteínas son estructuralmente muy diferentes a BCL-2 y a su vez distintas entre ellas, excepto por la presencia de la región BH3, imprescindible para el desarrollo de la función proapoptótica.^{213,214} La inducción de apoptosis por estrés celular requiere ambos tipos de proteínas proapoptóticas.

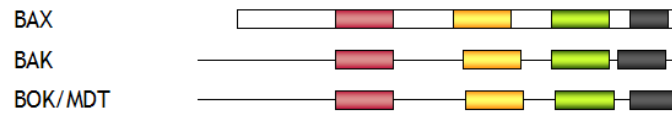
PROAPOPTÓTICOS

Tipo BCL-2



ANTIPOPTÓTICOS

Tipo BAX



“Sólo-BH3”

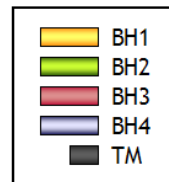
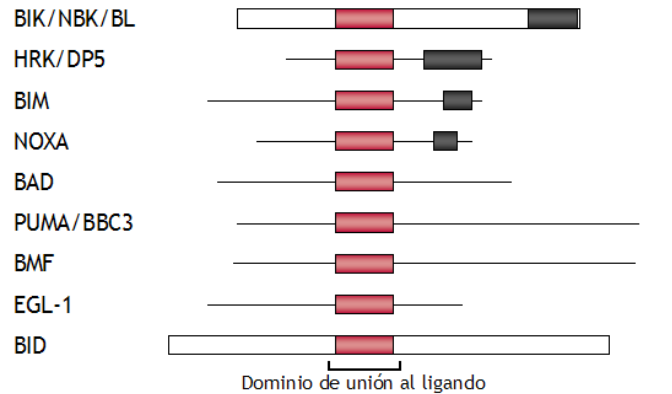


Figura 12. Estructura de los miembros de la familia de BCL-2. Las proteínas de la familia de BCL-2 se clasifican funcionalmente en tres tipos: los miembros del primer grupo se caracterizan por presentar cuatro dominios cortos BH1-BH4 (*BCL-2 homology*), así como un extremo hidrofóbico C-terminal, necesario para el enclavamiento de las proteínas en la membrana mitocondrial externa (TM, *transmembrane domain*). Todos los miembros de este grupo poseen actividad antiapoptótica. Por el contrario, las proteínas del segundo y tercer grupo presentan actividad proapoptótica. Los miembros de tipo BAX tienen una estructura muy similar a las del primer grupo pero carecen del dominio BH4. El tercer grupo está integrado por proteínas que únicamente tienen en común con los miembros de los otros grupos el dominio BH3. En la figura no aparecen aquellos miembros de la familia de BCL-2 cuya función está todavía por determinar (BOO/DIVA, BCL-Rambo, BCL-G, BCL-B, BNIP3, BFK). Sí se muestran las proteínas de *C. elegans* CED-9 y EGL-1.

Las proteínas “sólo BH3” parecen actuar como sensores de daño y antagonistas directos de BCL-2 y demás proteínas antiapoptóticas. Por el contrario, la subfamilia de proteínas “tipo BAX” actúa a un nivel posterior, permeabilizando la membrana mitocondrial externa y quizás el retículo endoplasmático y la membrana nuclear.

La función de BAX y BAK parece ser muy similar, incluso superponible en algunos casos, ya que la pérdida de uno de los dos genes tiene consecuencias mínimas en la mayoría de tejidos (*BAX* es necesario en la espermatogénesis y en ciertas células del sistema nervioso) mientras que la ausencia de ambas proteínas implica una resistencia a los estímulos intracelulares de muerte que actúan a través de la vía mitocondrial y es incompatible con la vida.²¹⁵ La principal diferencia estructural entre BAX y BAK es que BAX se encuentra mayoritariamente en el citoplasma de las células mientras que BAK se localiza en la cara citoplasmática de la membrana mitocondrial externa y del retículo endoplasmático. En respuesta a estímulos citotóxicos, BAX se transloca a estas membranas y ambas proteínas experimentan un cambio en su conformación, formando homo-oligómeros que contribuyen a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. El mecanismo mediante el cual tiene lugar esta permeabilización no se conoce con exactitud.^{207,216}

Inicialmente se consideró que las proteínas “sólo BH3” eran capaces de unirse a todos los miembros antiapoptóticos de la familia de BCL-2. Estudios

posteriores demostraron que existían uniones preferentes.²¹⁷ Así, mientras BIM, tBID y PUMA se unen a todas las proteínas antiapoptóticas, NOXA se une únicamente a MCL-1 y A1, y BAD sólo a BCL-2, BCL-X_L y BCL-W^{214,218} (figura 13). En este sentido cabe señalar que BIM y PUMA son mucho más potentes que el resto de miembros “sólo BH3” que presentan afinidad selectiva por algunas proteínas antiapoptóticas, aunque la combinación de NOXA y BAD induce apoptosis de manera igualmente efectiva. Todo ello indica que para que la apoptosis se desarrolle correctamente es necesaria la neutralización de varias proteínas antiapoptóticas y que éstas pueden no tener una función completamente equivalente.

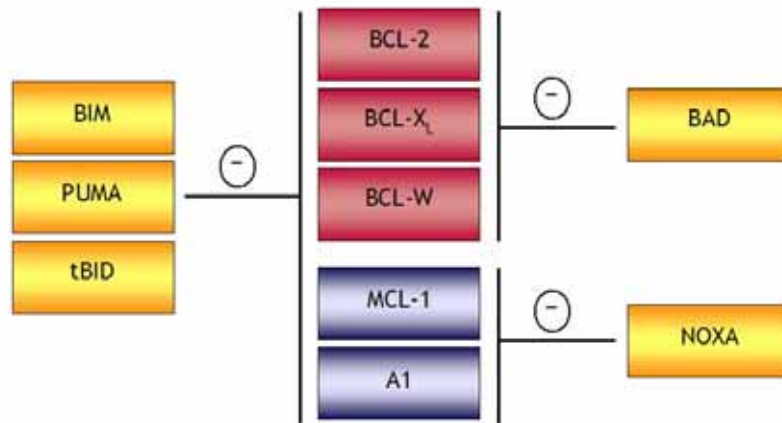


Figura 13. Uniones preferentes de los miembros “sólo BH3” de la familia BCL-2.

5.5.4.1. Mecanismos de activación

Las proteínas “sólo BH3” actúan a un nivel previo a BAX y BAK puesto que no inducen apoptosis en células carentes de ambas. Existen dos modelos que explican este fenómeno (figura 14):

- El modelo de activación indirecta, el más aceptado, se basa en el hecho de que todos los miembros “sólo BH3” se unen únicamente a proteínas antiapoptóticas, facilitando de este modo la activación de BAX y BAK. Según este modelo, BIM, tBid y PUMA son inductores más potentes de apoptosis que BAD y NOXA simplemente porque tienen la capacidad de unirse a todas las proteínas antiapoptóticas.^{214,218-220}
- El modelo de activación directa se considera en la actualidad minoritario y se basa en la existencia de dos tipos de proteínas, las activadoras (BIM y tBID principalmente, probablemente también PUMA), con capacidad para unirse y activar a BAX y BAK, y las sensibilizadoras (el resto de proteínas “sólo BH3”), que actuarían uniéndose sólo a los miembros antiapoptóticos, liberando a BIM y tBid y facilitando su unión con BAX y BAK.^{221,222}

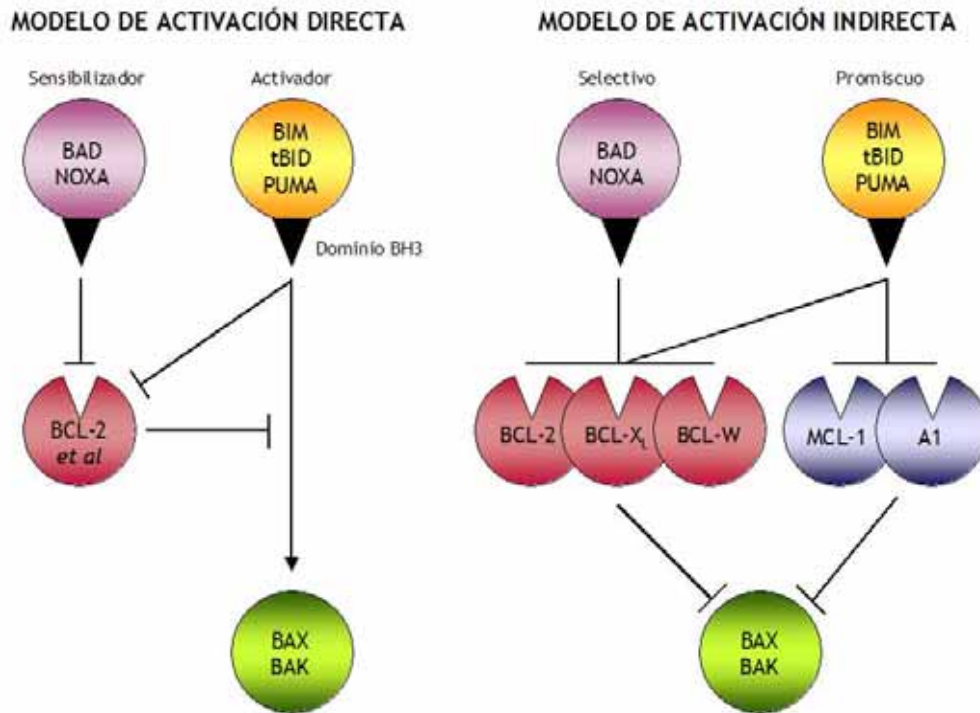


Figura 14. Modelos de activación directa e indirecta de BAX y BAK. En el modelo directo, los activadores putativos BIM, tBID y tal vez PUMA se unen directamente a BAX y BAK, activándolos, mientras que los sensibilizadores se unen únicamente a BCL-2 y a sus homólogos a través del dominio BH3. En el modelo de activación indirecta, las proteínas “sólo BH3” activan a BAX y BAK no mediante unión directa sino por desplazamiento de los miembros proapoptóticos, a los que sí se unen. Según este modelo, BIM, tBID y probablemente PUMA son más potentes que el resto de miembros “sólo BH3” al ser capaces de unirse a una mayor variedad de proteínas antiapoptóticas.

Según el modelo de activación indirecta, las proteínas antiapoptóticas inhiben la activación de BAX y BAK. En el caso de BAK esta inhibición ocurre por interacción directa con MCL-1 o BCL-X_L (no con BCL-2), siendo necesario el dominio BH3 para que tenga lugar dicha interacción.^{214,219,220} Este dominio resulta asimismo, fundamental para la oligomerización de BAK. Así, para que

BAK pueda promover la apoptosis debe tener lugar la inactivación de MCL-1 y BCL-X_L, por ejemplo, mediante su unión a NOXA y BAD, respectivamente (figura 15). Este modelo de activación sería igualmente válido en el caso de BAX aunque, en este caso, cualquier miembro antiapoptótico de la familia de BCL-2 (MCL-1, BCL-X_L, BCL-W y BCL-2) probablemente tenga capacidad inhibitoria.

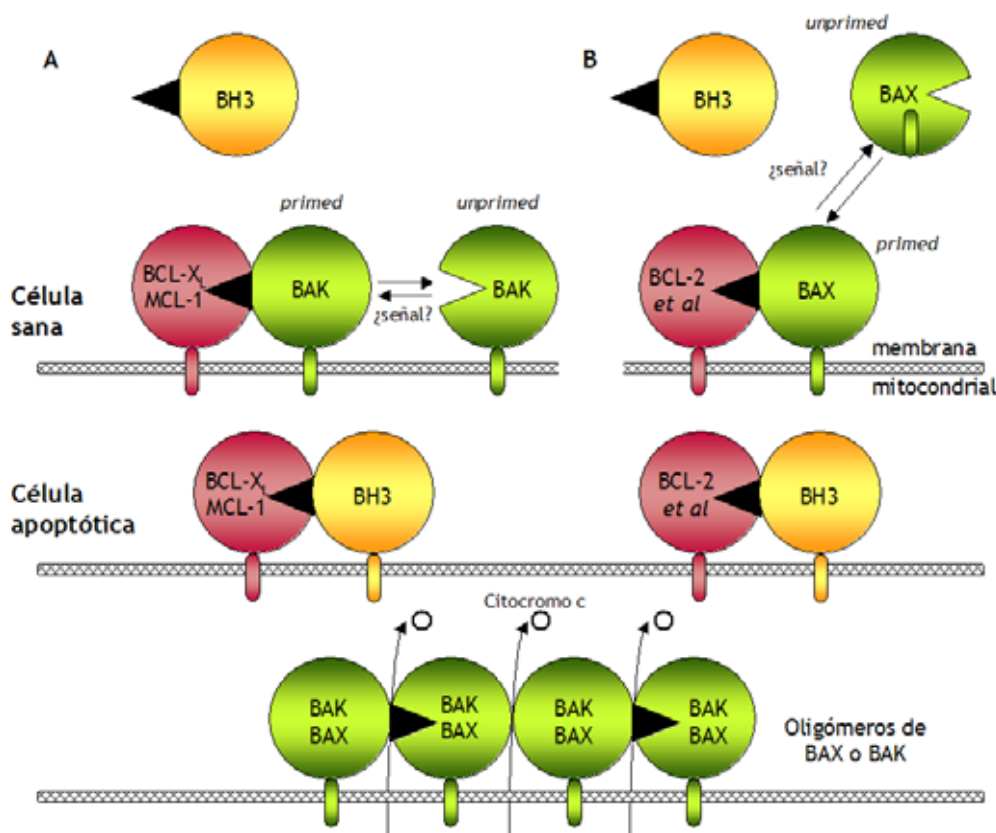


Figura 15. Modelos de regulación de BAX y BAK por los miembros antiapoptóticos. (A) En las células sanas, BCL-X_L y MCL-1 (pero no BCL-2) se unen a BAK en su conformación “*primed*” (con el dominio BH3 expuesto). La apoptosis tiene lugar únicamente si los miembros “sólo BH3” neutralizan la unión entre BAK y las proteínas antiapoptóticas. La forma “*primed*” de BAK es capaz entonces de formar oligómeros. (B) La regulación de BAX es similar pero su distribución es citoplasmática y todos los miembros antiapoptóticos (“BCL-2 *et al*”) pueden inhibir su activación. No se conoce con certeza si en las células sanas se encuentran moléculas de BAX y BAK en su conformación “*primed*” en número limitado o si éstas aparecen en fases muy tempranas de la apoptosis, en respuesta a alguna señal desconocida.

5.5.4.2. Función y regulación

- Proteínas “sólo BH3”

Son las proteínas iniciadoras de la apoptosis, no sólo en respuesta a estímulos fisiológicos como la privación de citoquinas o el desprendimiento de la matriz celular sino también en relación a señales derivadas de la activación de oncogenes, daño al ADN, fármacos citotóxicos o irradiación.²¹³ Algunas de ellas se expresan únicamente en determinados tipos celulares, controlan compartimentos subcelulares concretos y responden a estímulos específicos²²³ (figura 16). BIM es el principal regulador de la homeostasis de la hematopoyesis, resulta fundamental para la eliminación de los linfocitos autorreactivos *in vivo*²²⁴ y para la apoptosis de las células T *in vitro* tras la privación de citoquinas y la incubación con paclitaxel.²²⁵ BAD es necesario para la apoptosis tras la privación de glucosa²²⁶ o, en algunos casos, de factor de crecimiento epidérmico.²²⁷ BMF desempeña un papel importante en el fenómeno de anoikis, la muerte celular por apoptosis que experimentan las células epidérmicas al desprenderse de la matriz extracelular.²²⁸ NOXA y PUMA (también denominada bbc3), activadas por p53 son fundamentales en la apoptosis tras la inducción de daño al ADN,^{229,230} por lo que desempeñan un papel relevante en la apoptosis inducida por fármacos citotóxicos.²³¹ Recientemente se ha descrito, asimismo, que NOXA puede ser activada de manera independiente de p53 en diferentes modelos celulares.^{232,233}

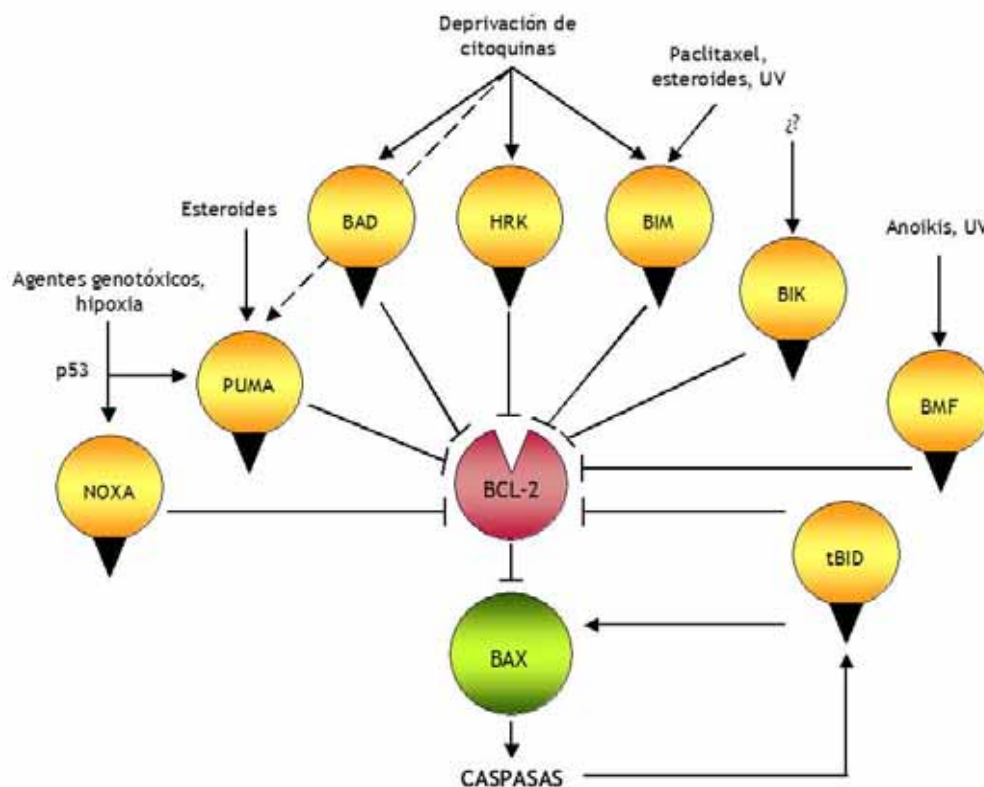


Figura 16. Activación de las proteínas “sólo BH3”. Los diferentes miembros “sólo BH3” de la familia de BCL-2 se activan en distintas situaciones que, en ocasiones, pueden solaparse. Su activación puede ser transcripcional (HRK, NOXA, PUMA) o principalmente postranslacional (BIM, BMF, BAD, BIK, BID).

Para algunas proteínas “sólo BH3”, el ensamblaje con miembros antiapoptóticos no requiere únicamente el dominio BH3 sino el dominio hidrofóbico C-terminal que permite la inserción de la proteína en la membrana (dominio TM, transmembrana). En el caso de BIM, por ejemplo, este último dominio es necesario para su unión a la membrana mitocondrial y para el desarrollo de su actividad proapoptótica.²³⁴ BID, sin embargo, carece de región hidrofóbica y la inserción en la membrana requiere su proteólisis,

que da lugar a tBid,²³⁵ el cual interacciona con la cardiolipina presente en la membrana mitocondrial.²³⁶

BID representa una excepción entre las proteínas “sólo BH3”, que se unen de manera selectiva a los miembros antiapoptóticos, al ser capaz de unirse *in vitro* a proteínas antiapoptóticas tipo BCL-2 y proapoptóticas tipo BAX, si bien esta última circunstancia sólo tiene lugar en determinadas condiciones.²³⁷⁻²³⁹ En este sentido, la incubación de tBID con mitocondrias promueve la oligomerización de BAK y la liberación de citocromo c sin que se detecten complejos BID-BAK, por lo que la activación de BAX y BAK se produce muy probablemente de manera indirecta en la gran mayoría de situaciones.²⁴⁰

La multiplicidad de proteínas “sólo BH3” en mamíferos hace suponer que permite un mayor control sobre la apoptosis; como consecuencia, la regulación de estas proteínas es compleja e implica diversos mecanismos, tanto a nivel transcripcional como postranslacional. Así, suelen encontrarse en la célula en estado latente hasta que son activadas por diversos mecanismos. BAD está secuestrada por proteínas 14-3-3 tras su fosforilación por las quinasas Akt/PKB y la proteína quinasa A.²⁴¹ Su activación requiere que sea defosforilada, por ejemplo por la calcineurina. Por el contrario, la activación de BIK requiere su fosforilación, posiblemente por la caseína quinasa II.²⁴² BID es proteolizado por caspasas o granzima B, fenómeno probablemente regulado por fosforilación.²⁴³ BIM y BMF están relacionados con el control del citoesqueleto.^{228,244} En las células sanas, las dos formas

mayoritarias de BIM (BIM_{EL} y BIM_L) están secuestradas por el complejo motor de la dineína en los microtúbulos. De manera similar, BMF está unido al complejo motor de la miosina V. La exposición a radiaciones UV induce la liberación de BIM y BMF mediante fosforilación. En el caso de BIM, su fosforilación por la quinasa c-Jun N-terminal parece potenciar su actividad proapoptótica²⁴⁵ pero, por el contrario, la fosforilación por Erk desencadena su degradación por el proteasoma.²⁴⁶

- Proteínas antiapoptóticas de tipo BCL-2

Estudios genéticos llevados a cabo en ratones sugieren que para la supervivencia de todos los tipos celulares es necesaria la protección de, como mínimo, un homólogo de BCL-2. A pesar del solapamiento en los patrones de expresión de estas proteínas, la inactivación de genes concretos da lugar a diferentes fenotipos, probablemente porque los diversos miembros son más abundantes en unos u otros tejidos.²⁴⁷ BCL-2 es esencial para la supervivencia de los precursores de las células renales y de los melanocitos, así como de los linfocitos maduros.^{248,249} BCL-X_L desarrolla un papel fundamental en los precursores neuronales y eritroides,^{250,251} BCL-W en los progenitores de los espermatozoides en adultos²⁵² y A1 en los neutrófilos.²⁵³ MCL-1 es imprescindible para la implantación y supervivencia del cigoto²⁵⁴ y su eventual supresión ha puesto de manifiesto su papel fundamental en la linfopoyesis B y

T,²⁵⁵ en las fases tempranas de la hematopoyesis²⁵⁶ y en la supervivencia de los neutrófilos maduros pero no de los macrófagos.²⁵⁷

Los niveles y la actividad de las proteínas antiapoptóticas están regulados por diversos mecanismos, que incluyen el control transcripcional y las modificaciones en las propias proteínas. Los niveles de BCL-X_L, A1 y MCL-1, por ejemplo, están íntimamente relacionados con el aporte de citoquinas, que afecta su síntesis y su estabilidad. MCL-1 es especialmente lábil y se degrada rápidamente por la vía del proteasoma ante diversos estímulos citotóxicos.²¹⁷ Los niveles de BCL-2 parecen estar controlados, al menos en parte, por micro-RNAs²⁵⁸ y su actividad está regulada mediante fosforilación a través de mecanismos complejos.²⁵⁹

Numerosos estudios indican que para una correcta homeostasis es imprescindible el equilibrio entre los niveles de proteínas antiapoptóticas y de miembros “sólo BH3”. En este sentido, la sobreexpresión de las primeras ocasiona una acumulación anómala de células hematopoyéticas²⁶⁰ y neuronales.²⁶¹ La función protectora que las proteínas “sólo BH3” ejercen en las células sanas está mediada por las proteínas proapoptóticas de tipo BAX, ya que ninguno de los miembros “sólo BH3” es capaz de inducir apoptosis en ausencia de BAX y BAK.^{262,263} El mecanismo por el que ello ocurre, básicamente si se trata de una activación directa o indirecta, ha sido y es motivo de numerosos estudios.^{210,264}

- Proteínas proapoptóticas de tipo BAX

Las proteínas de tipo BAX son fundamentales para la apoptosis. Aunque la inactivación de *BAX* o *BAK* en modelos murinos tiene consecuencias mínimas, probablemente por el solapamiento funcional entre ambos, la eliminación de ambos genes produce la muerte en el periodo perinatal.²⁶⁵ De manera similar a lo que ocurre con la ausencia de *BIM*, la pérdida simultánea de *BAX* y *BAK* altera la selección tímica y la homeostasis linfoide.²⁶⁶

En respuesta a estímulos citotóxicos, BAX y BAK experimentan un cambio conformacional y forman oligómeros en la membrana mitocondrial. Ni las señales que activan a BAX y BAK ni el mecanismo de formación de los oligómeros se conocen con exactitud.²⁴⁷ Se ha sugerido que, en las células sanas, BAX podría estar secuestrado en el citoplasma por alguna proteína (14-3-3, Ku70 o el péptido humanina) mientras que una proporción de BAK se encontraría en la membrana mitocondrial externa unido a la proteína VDAC (*voltage-dependent anion channel*)-2. Una vez activadas, las proteínas de tipo BAX alteran la membrana mitocondrial y permiten la salida al citoplasma de varias moléculas mediadoras de la apoptosis: el citocromo c, que activa a Apaf-1²⁶⁷; Smac/Diablo y Omi/HtrA2, que antagonizan a las IAPs en su unión a las caspasas^{187,188,202}; la flavoproteína AIF (*apoptosis-inducing factor*), implicada en la condensación de la cromatina y la degradación del ADN²⁶⁸ pero también en la protección neuronal de la apoptosis mediada por

peróxido²⁶⁹; y la endonucleasa G, que también participa en la fragmentación del ADN.²⁷⁰

El mecanismo por el que BAX y BAK permeabilizan la membrana mitocondrial es controvertido.^{171,247} Existen diversas hipótesis al respecto, ninguna de las cuáles se ha confirmado (figura 17): (i) que los estímulos proapoptóticos alteren la fisiología mitocondrial (el intercambio iónico y la fosforilación oxidativa, por ejemplo) y como consecuencia tenga lugar una ruptura física de la membrana mitocondrial externa y la liberación de las proteínas del espacio intermembrana al citosol²⁷¹. Este modelo parece en la actualidad el menos probable; (ii) que BAX y BAK interaccionen con otras proteínas de la membrana mitocondrial externa, principalmente con VDAC,²⁷² subunidad del PTP mitocondrial (*mitochondrial permeability transition pore*), un canal cuya apertura genera una rápida caída del potencial de membrana mitocondrial²⁷³; (iii) que, tras experimentar un cambio conformacional, BAX y BAK se inserten en la membrana mitocondrial externa formando canales o incluso agujeros, de manera similar a lo que ocurre con la toxina diftérica, a la que BCL-X_L se asemeja estructuralmente.²⁷⁴ En este modelo, la estructura de BID y la composición lipídica de la membrana facilitarían la formación de poros, aunque la composición exacta de los mismos sigue siendo objeto de debate.^{237,275}

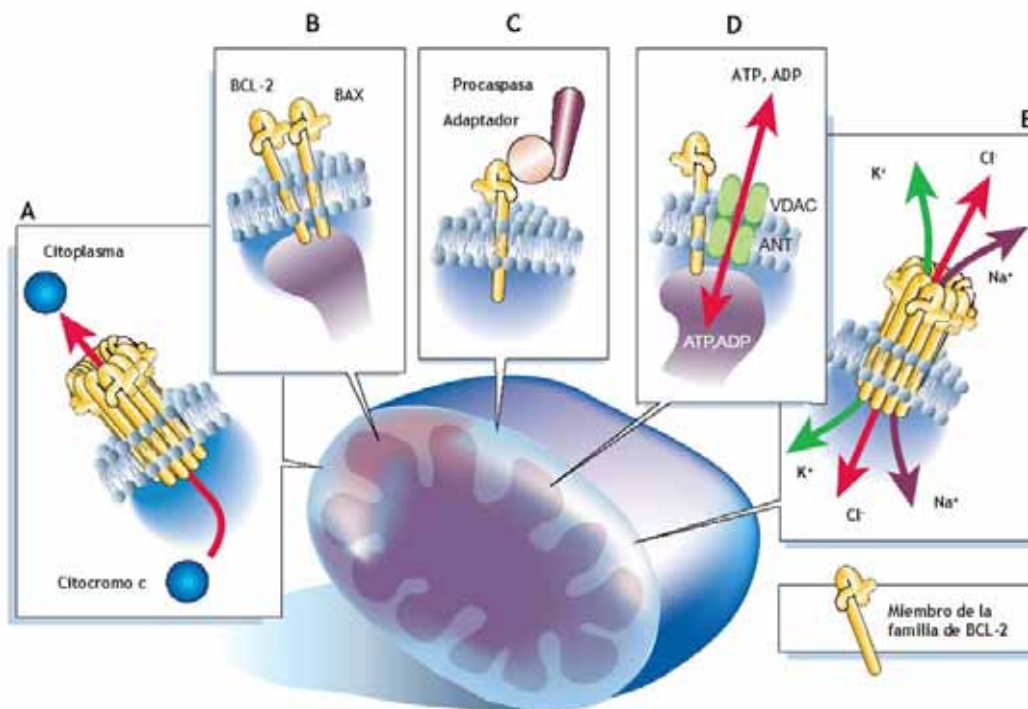


Figura 17. Interacción de los miembros de la familia de BCL-2 con la membrana mitocondrial. (A) Formación de un poro a través del cual se produciría la salida del citocromo c y otras proteínas del espacio intermembrana al citoplasma. **(B)** Heterodimerización entre miembros anti- y proapoptóticos. La dimerización tendría lugar cuando el dominio BH3 de una de las moléculas se uniera al bolsillo hidrofóbico formado por los dominios BH1, BH2 y BH3 de la otra molécula. **(C)** Regulación directa por caspasas a través de moléculas adaptadoras, de manera similar a lo que ocurre en *C. elegans*. Aunque Apaf-1 (homóloga de CED-4) probablemente no es una molécula diana de la familia de BCL-2, se han descrito, en mamíferos, otras proteínas adaptadoras que sí lo son. **(D)** Interacción con otras proteínas mitocondriales como VDAC y ANT (*adenosine nucleotide transporter*), que originaría la formación de un poro que permitiría la liberación del citocromo c o que modularía la homeostasis mitocondrial, por ejemplo mediante la apertura del PTP. **(E)** Oligomerización para la formación de un canal iónico selectivo.

5.5.4.3. Desregulación y oncogénesis

- Las proteínas antiapoptóticas como oncoproteínas

La capacidad oncogénica de BCL-2 se puso de manifiesto al demostrar su implicación en la t(14;18)(q32;q21) en el LF. En esta translocación, el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (14q32) activa la expresión constitutiva de *BCL-2* (18q21) en la clona patológica. De igual modo, en algunos casos de linfoma difuso de células grandes B (LDCG-B) y de LLC, translocaciones variantes de *BCL-2* con los genes de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas originan una sobreexpresión de la proteína BCL-2.

Estudios llevados a cabo en ratones con translocación de *BCL-2* evidencian un incremento en la incidencia de linfomas B. Sin embargo, estos tumores son de lento crecimiento y de penetrancia baja, lo que sugiere que la sobreexpresión de *BCL-2* aislada no es excesivamente oncogénica y que la progresión tumoral requiere la presencia de otras alteraciones concomitantes.^{276,277} La detección de reordenamientos de *BCL-2* en un pequeño porcentaje de linfocitos circulantes en algunos individuos sanos avala esta hipótesis.²⁷⁸ En el caso del LF no es infrecuente un curso clínico indolente, de manera que los estadios más precoces de esta patología probablemente representan tan sólo una acumulación excesiva de linfocitos B protegidos por la translocación de *BCL-2* en una situación de estimulación antigénica crónica.^{278,279} La transformación del LF a otras formas más

agresivas se asocia, en determinadas ocasiones, a translocaciones de *MYC*.²⁸⁰ De igual manera, la coexpresión de *BCL-2* y *MYC* es capaz de inducir la transformación en células progenitoras hematopoyéticas,^{277,281} células epiteliales de mama²⁸² y células β pancreáticas.^{283,284} Este sinergismo entre *BCL-2* y *MYC* probablemente representa la inhibición, por parte de *BCL-2* y sus homólogos, de la apoptosis inducida por *MYC* en situaciones subóptimas para la supervivencia celular^{281,285,286} pero también puede reflejar la capacidad de *MYC* para contrarrestar la inhibición de la entrada en ciclo celular mediada por *BCL-2*.²⁸⁷⁻²⁸⁹

Presumiblemente, todos los miembros antiapoptóticos de la familia de *BCL-2* tienen capacidad oncogénica. Sin embargo, las mutaciones que afectan directamente a éstos son extraordinariamente infrecuentes en las neoplasias malignas. Otras alteraciones actúan de manera indirecta, aumentando los niveles de expresión de las proteínas con función antiapoptótica. Por ejemplo, mutaciones que afecten la actividad del factor de transcripción nuclear NF- κ B inducen la expresión de los genes *BCL-X_L* y *A1*.²⁹⁰ Por el contrario, las mutaciones que inactivan la vía supresora de tumores de pRB o que promueven la activación de *MYC* inducen la expresión de p53, entre cuyas dianas se encuentran *BAX*, *PUMA* y *NOXA*.^{123,131} Dado que la vía RB/*MYC*/p53 se encuentra alterada en prácticamente todos los tumores,²⁹¹ un cierto grado de desregulación de las proteínas de la familia de *BCL-2* durante la oncogénesis es, asimismo, universal (figura 18).

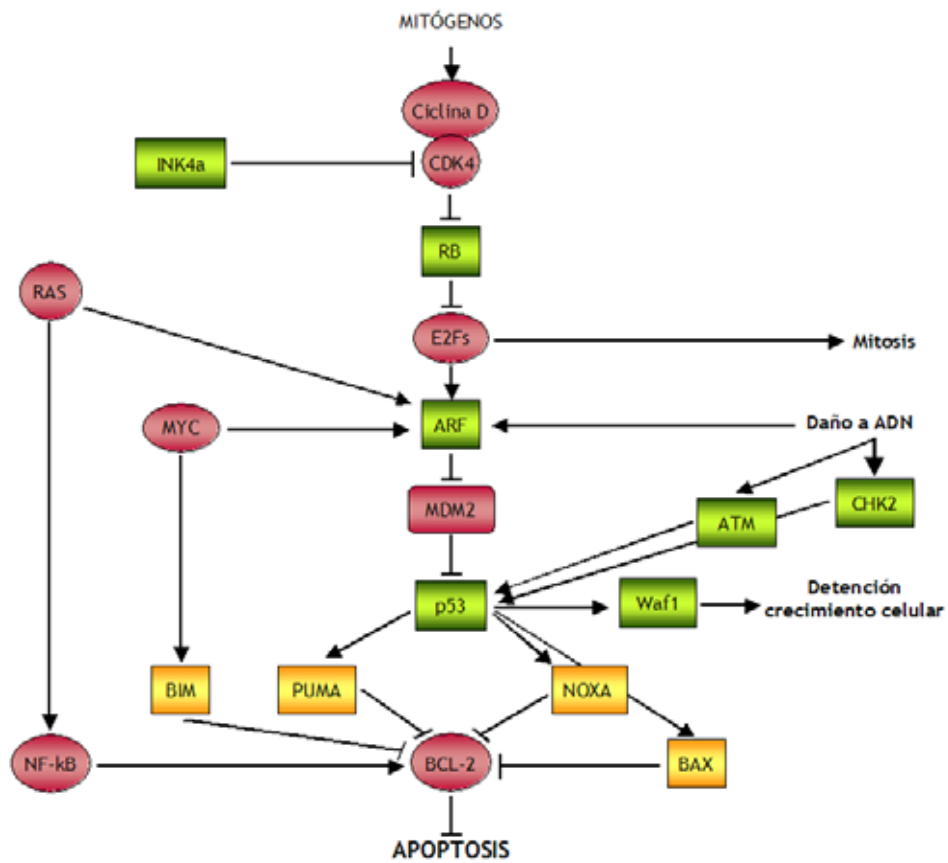


Figura 18. BCL-2 y las vías RB/Arf/p53. La inactivación de la vía del RB, por ejemplo, por pérdida del inhibidor del ciclo celular INK4a, da lugar a la fosforilación de pRB por los complejos ciclina-CDK, aumentando la actividad transcripcional de E2F. De este modo aumenta la expresión de p14^{Arf}, diana transcripcional de MYC. p14^{Arf} secuestra a MDM2, regulador negativo de la actividad de p53. Los niveles aumentados de p53 pueden detener la progresión del ciclo celular a través de la expresión de p21^{Waf1} o inducir la entrada de la célula en apoptosis a través de BAX, PUMA y NOXA.

- Proteínas oncogénicas.
- Proteínas supresoras de tumores

- Las proteínas proapoptóticas como supresoras de tumores

El potencial oncogénico de los miembros antiapoptóticos de la familia de BCL-2 sugiere que las proteínas con función antiapoptótica pueden comportarse como supresoras de tumores. Al existir un cierto solapamiento entre los miembros “sólo BH3” por un lado y las proteínas de tipo BAX por otro, la función supresora de tumores sólo se pondría de manifiesto en determinados tipos celulares y en situaciones concretas.

El miembro proapoptótico más representativo en este sentido es BIM, uno de los principales reguladores de la homeostasis en el sistema linfóide. El gen *BIM* se localiza en 2q12-13, una región en la que se han descrito alteraciones (con mayor frecuencia deleciones) en neoplasias malignas, principalmente hemopatías.²⁹² La pérdida de *BIM* por sí sola no aumenta la incidencia tumoral en ratones hasta los 12 meses de vida pero la pérdida de un único alelo acelera la leucemogénesis en ratones transgénicos que expresan *MYC* durante la linfopoyesis B.²⁹³

Las proteínas “sólo BH3” contribuyen a la génesis tumoral en otras líneas celulares distintas a la linfóide B. Aunque la inactivación de *BID* no altera la homeostasis durante el desarrollo, el 50% de los ratones que no expresan *BID* desarrollan una leucemia mielomonocítica crónica a los 2 años.²⁹⁴ Las alteraciones de *BCL-X_L* están implicadas en el desarrollo de leucemias mieloides y linfoides T en ratones.²⁹⁵ *NOXA* y *PUMA*, inducidos a

nivel transcripcional por p53, son necesarios para la apoptosis en numerosos tipos celulares.^{229,230} En líneas de carcinoma colorrectal, *PUMA* es imprescindible para la apoptosis inducida por p53 en células p21^{-/-}.²⁹⁶ Por otro lado, la alteración a nivel génico en ratones demuestra que la pérdida de *NOXA* sólo disminuye moderadamente la apoptosis inducida por p53^{231,297} mientras la pérdida de *PUMA* aumenta de manera notoria la supervivencia celular²³¹ En tipos celulares que expresan *NOXA* y *PUMA*, la pérdida de la función supresora de tumores requeriría la pérdida de ambos genes.

En el caso de *BAX* y *BAK*, de funciones muy similares y en algunos casos superponibles²⁶⁵ parece necesaria la inactivación de ambos genes para el desarrollo tumoral. Sin embargo, el hecho de que algunas neoplasias colorrectales^{298,299} y hematológicas³⁰⁰ presenten mutaciones de *BAX* o de *BAK* sugiere que determinados estímulos citotóxicos son específicos para *BAX* o que la expresión únicamente de *BAK* en determinados tipos celulares es insuficiente para mediar la apoptosis.

5.6. Alteraciones de la apoptosis en el LCM

En los últimos años, diversos trabajos han sugerido que eventuales alteraciones en los mecanismos reguladores de la apoptosis podrían estar implicadas en la patogenia del LCM. En un estudio publicado por Hermann y cols., los casos de LCM analizados presentaban, junto con los casos de LF, los

menores índices apoptóticos observados, que los autores relacionaban con la expresión disminuida de BCL-X y elevada de MYC.³⁰¹ En el LCM se había descrito, asimismo, la expresión de niveles elevados de CD40 junto con niveles disminuidos o incluso ausencia de Fas, patrón que favorecería la supervivencia de las células tumorales.³⁰²

Las primeras evidencias de que los defectos en las vías de apoptosis podían contribuir al desarrollo del LCM fueron aportadas por Hoffman y cols., quienes analizaron mediante *arrays* de oligonucleótidos el patrón de expresión génica en ganglios linfáticos de pacientes afectados de LCM y en hiperplasias reactivas.³⁰³ Entre los genes diferencialmente regulados que parecían desempeñar un papel importante en el desarrollo del LCM se encontraban factores de transcripción (*AP2*, *ATF1*, *DP2*, *E2F5*, *JUN*, *MYC* y *CDC8*, entre otros), genes relacionados con el ciclo celular (*CCND1*, *CCNG2*, *CDK4*, *MDM2*, *RB1*, *SKP2*), con factores de crecimiento y sus receptores (*IL-1R*, *IL-3*, *IL-8*, *IL-13*, *IL-18*), e implicados en vías de señalización intracelular (*PRKCB1*, *PRKM8*, *REL*). Además de estos genes, todos ellos sobreexpresados, numerosos genes relacionados con la apoptosis presentaban una disminución en su expresión. Entre estos últimos destacaban *CYC1* (citocromo C1), *CASP9* (caspasa 9), *FADD* (*Fas-associated via death domain*), *RAIDD* (*CASP2 and RIPK1 domain-containing adaptor with death domain*), *DAXX* (*Death-associated protein 6*) y *PDCD1* (*Programmed cell death 1*). De ese modo, el patrón global observado favorecía la inhibición de la apoptosis y sugería que la falta de regulación en el proceso de muerte celular programada podía ser un eslabón adicional en el

desarrollo del LCM. No obstante, y a diferencia de lo observado en la LLC, la desregulación de la apoptosis en el LCM desempeñaría un papel secundario respecto de la alteración de numerosos mecanismos relacionados con la proliferación celular.³⁰⁴

La sobreexpresión de proteínas con función antiapoptótica representa una vía alternativa de inhibición de la apoptosis en las células tumorales. El mejor ejemplo lo constituye, sin duda, el aumento en la expresión de BCL-2 que se observa en la mayoría de SLPC-B denominados indolentes, caracterizados por la acumulación de células neoplásicas con anomalías en sus programas de muerte celular. La sobreexpresión de BCL-2 en el LCM es un hecho conocido.³⁰³⁻³⁰⁶ Por otro lado, la expresión aberrante de MCL-1, proteína con función antiapoptótica e implicada Asimismo, en la regulación de la progresión del ciclo celular,³⁰⁷ se ha relacionado con el desarrollo de algunos tipos de linfomas.³⁰⁸ Khoury y cols. han demostrado recientemente que la expresión de MCL-1 en el LCM, analizada mediante *Western blot* e inmunohistoquímica, es heterogénea y que niveles elevados de expresión se observan con mayor frecuencia en las variantes blastoides y se asocian a un mayor índice proliferativo y a la sobreexpresión de p53.³⁰⁹ En este sentido, la expresión elevada de MCL-1 en determinados casos de LCM debe considerarse un fenómeno aberrante, ya que los linfocitos B del manto folicular no expresan esta proteína en condiciones normales. Los mecanismos responsables de esta sobreexpresión no se conocen con exactitud aunque numerosas vías de señalización han sido implicadas en la regulación de la expresión de MCL-1 en

diversos modelos experimentales, entre ellas las que afectan a JAK/STAT, MAPK y PI3K/Akt. Por otro lado, el mayor índice proliferativo observado en los casos con expresión elevada de MCL-1 no se acompaña de un aumento en el índice apoptótico, lo que sugiere que la expresión de MCL-1 puede contribuir realmente a esta disociación.

El papel de survivina en la patogenia del LCM ha sido analizado recientemente en líneas celulares y biopsias de pacientes afectados.³¹⁰ La expresión nuclear de survivina pudo ser detectada en un número variable de células, que oscilaba entre el 5% y el 95%, y era especialmente intensa en metafase, anafase y telofase, con un marcaje intenso de los cromosomas. La mayor expresión de survivina se observó en las variantes blásticas, se relacionó con la actividad proliferativa del tumor y se asoció a una menor supervivencia global. Cabe destacar que los casos pleomórficos, el 83% de ellos tetraploides, mostraron una expresión de survivina similar a la observada en los LCM típicos, por lo que la expresión de esta proteína no parece estar implicada en la génesis de este tipo de aberraciones cromosómicas. Tampoco se observó relación entre el nivel de expresión de survivina y el grado de activación de caspasa 3, analizado mediante marcaje de su fragmento proteolítico. Sin embargo, la expresión de la forma proteolítica de caspasa 3 era virtualmente inexistente en la mayoría de casos y no se observó coexpresión de survivina y caspasa 3 proteolítica en la misma célula tumoral en ningún caso. De este modo, el bajo índice apoptótico observado y la

detección de survivina en los LCM apoyan su función inhibidora de la apoptosis.

Recientemente se ha identificado en líneas celulares de LCM la existencia de deleciones homocigotas de *BIM* a raíz de la detección de pérdidas frecuentes de material genómico nivel de 2q13 en líneas y pacientes afectos de LCM.⁹⁴ Estos datos, junto con el hecho de que los linfocitos B que no expresan *BIM* son refractarios a determinados tipos de apoptosis²²⁴ y a la relación existente entre pérdida de *BIM* e inicio de la oncogénesis,²⁹³ sugieren que *BIM* podría ser un gen supresor de tumores y que su expresión disminuida podría contribuir al desarrollo del LCM. Estos datos se han confirmado en un estudio posterior,³¹¹ en el cual se ha observado, asimismo, la existencia de deleciones homocigotas de *INK4c/p18* y de inactivaciones no debidas a deleción, mutación ni hipermetilación del gen que, sin embargo, implicaban una expresión indetectable de p18 en el 77% de los LCM analizados. Cabe destacar que la ausencia de expresión de p18 correlacionaba con el estado no mutado de IgV_H.

La elevada frecuencia de deleciones de la región 8p21-22 observada en el LCM^{92,93} y el conocimiento de que en esta región están localizados los genes que codifican para los receptores de TRAIL han llevado a varios grupos a investigar las posibles alteraciones de estos genes en el LCM. La coexistencia de deleciones monoalélicas con mutaciones del alelo no delecionado y/o metilación del promotor es un mecanismo frecuente de inactivación de genes

supresores de tumores. En este sentido, se ha descrito la existencia de mutaciones de los genes *TRAIL-R1* (*DR4*) y *TRAIL-R2* (*DR5*) en linfomas B y tumores sólidos.³¹² En la mayoría de casos, estas mutaciones afectan al dominio de muerte y, ocasionalmente, al dominio de unión del receptor al ligando. En el estudio realizado por Fernández y cols. en una serie de 209 casos, que incluía 69 LCM, no se detectaron mutaciones con inactivación de *TRAIL-R1* o *TRAIL-R2*.³¹³ Sin embargo, sí se observaron dos polimorfismos en *TRAIL-R1* que aparecían con mayor frecuencia en los pacientes afectos de diversos tipos de LNH que en la población control. Así, el polimorfismo *A1322G* del dominio de muerte de *TRAIL-R1* se observó en el 37.5% de LCM y el 34.8% de LLC pero únicamente en el 17.6% de la población control, lo que sugiere que podría asociarse con un riesgo aumentado de desarrollar este tipo de tumores. El hecho de que el polimorfismo *A1322G* dé lugar a un receptor *TRAIL-R1* con menor sensibilidad a la señal de muerte inducida por *TRAIL* podría facilitar el desarrollo de clonas neoplásicas al dotarlas de una cierta resistencia a la apoptosis. Por el contrario, la presencia del polimorfismo *C626G* del dominio de unión al ligando se asoció con un efector protector significativo para el desarrollo del LCM. En cuanto a *TRAIL-R2*, no se detectaron mutaciones ni variantes polimórficas. Así, la escasa frecuencia de mutaciones en los genes *TRAIL-R1* y *TRAIL-R2* observada en esta serie, que incluía 6 casos con deleciones de 8p, parece indicar que estas alteraciones no son causa de la resistencia a *TRAIL* observada en estas neoplasias.³¹⁴

La ausencia de mutaciones y de mecanismos de inactivación epigenética de *TRAIL-R1* y *TRAIL-R2* ha sido confirmada recientemente en un estudio llevado a cabo por Rubio-Moscardo y cols.³¹⁵ En este trabajo, en el cual se confirma la frecuente existencia de polimorfismos, se sugiere que *TRAIL-R1* y *-R2* se comportarían como genes supresores de tumores haploinsuficientes. De esta manera, la pérdida de uno de los dos alelos sería suficiente para promover el desarrollo tumoral a través de una disminución en la cantidad de gen y, por tanto, de proteína, pese a la retención de un alelo funcional no mutado. En este sentido, la pérdida hemigota de los genes *TRAIL-R1* y *-R2* que tiene lugar en presencia de deleciones de 8p21.3 se acompañó de una disminución en la expresión de los receptores en la superficie celular, evidenciada mediante citometría de flujo. Los niveles de apoptosis inducida por TRAIL fueron dependientes de la cantidad de expresión génica y proteica de *TRAIL-R1* y *-R2* y la resistencia a la apoptosis observada en las líneas celulares con deleción de 8p pudo ser revertida tras la transfección de *TRAIL-R1* y *-R2*. Los datos de este estudio indican, asimismo, que la vía extrínseca de apoptosis no se encuentra alterada estructuralmente en el LCM.

Por el contrario, en un trabajo publicado recientemente por Roué y cols. en el que se analiza la sensibilidad a TRAIL *in vitro* en células primarias y en líneas celulares de LCM, la resistencia a TRAIL observada en una minoría de casos no se relacionó con los niveles de expresión del receptor de TRAIL ni se asoció a la pérdida de 8p sino que dependió de los niveles de c-FLIP (*cellular*

FLIP).³¹⁶ La inhibición de la vía de NF- κ B (activada constitutivamente en el LCM) con bortezomib y, principalmente, con inhibidores de IKK (*I κ B kinase*, quinasa que fosforila a los inhibidores de NK- κ B, favoreciendo su degradación vía proteasoma) indujo la muerte celular por apoptosis en todos los casos y se acompañó de una disminución en los niveles de c-FLIP.

6. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El LCM afecta predominantemente a varones (ratio varones/mujeres: 2-7/1) de edad avanzada (mediana de edad al diagnóstico: 60-65 años; extremos: 29-85 años).^{28,44,46,74,317} La mayoría de los pacientes son diagnosticados en estadios avanzados (Ann Arbor III-IV), en la mayoría de casos por la existencia de infiltración medular (80-90%). En general, menos del 50% de los enfermos presentan síntomas B o mal estado general (ECOG ≥ 2). El 60% de pacientes presentan adenopatías periféricas mientras que entre el 40% y el 50% de los casos suele documentarse hepatomegalia, esplenomegalia o ambas. La afección de territorios extraganglionares tiene lugar en aproximadamente el 90% de los pacientes. Una forma de infiltración intestinal característica aunque no exclusiva del LCM es la poliposis linfomatoide múltiple. Aunque según la mayoría de series publicadas el tracto gastrointestinal se halla infiltrado en el 15-30% de los pacientes, la realización sistemática de endoscopias digestivas ha mostrado que la afección del tracto digestivo tiene lugar en la práctica totalidad de los enfermos, que suelen encontrarse asintomáticos o presentar síntomas inespecíficos.^{55,318} Así, la realización de estudios digestivos mediante fibrogastroscofia y fibrocolonoscopia, con toma de biopsias en áreas macroscópicamente alteradas y en mucosa normal, ha puesto de manifiesto la elevada frecuencia de infiltración linfoide en estos casos. Otros territorios extraganglionares que se ven afectados con menor frecuencia son anillo de Waldeyer,³¹⁹ piel,^{320,321} pulmón,³²² mama,³²³⁻³²⁵ y tejidos blandos, principalmente periorculares.³²⁶ La

frecuencia de infiltración del sistema nervioso central (SNC) no está bien establecida, aunque se ha descrito entre el 4% y el 22%, en la mayoría de ocasiones en enfermos con LCM en progresión o recaída. La presencia de anemia o plaquetopenia se observa en aproximadamente el 25% de pacientes. La frecuencia de expresión hemoperiférica oscila entre el 13% y el 77% en las distintas series publicadas. Alrededor del 50-60% de los enfermos presentan cifras elevadas de LDH y β_2 -microglobulina séricas. En algunos pacientes puede detectarse la presencia de un componente monoclonal sérico, en general de tipo IgG y ocasionalmente IgM.

7. TRATAMIENTO

En la actualidad no existe ningún tratamiento que pueda ser considerado estándar para el LCM en primera línea ni en recaída.³²⁷⁻³³¹ Diversos regímenes han demostrado su capacidad para inducir respuestas pero la recidiva tumoral tiene lugar eventualmente en todos los casos y los pacientes fallecen como consecuencia de ello. Así, aunque la tasa de respuestas se sitúa entre el 70% y el 85%, sólo alrededor del 20-40% de los pacientes alcanza la remisión completa (RC) y los resultados a largo plazo prácticamente no se han modificado pese a la introducción de nuevas modalidades terapéuticas.

La utilización de regímenes quimioterápicos con adriamicina ha sido evaluada por diversos grupos. En el único estudio aleatorizado, no se observó ningún beneficio con la incorporación de adriamicina al esquema COP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona).³³² Por el contrario, en un estudio retrospectivo realizado por Zucca y cols. sí se observó una superioridad de los esquemas que contenían adriamicina en términos de RC, supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG).³² Desde entonces, los regímenes de tipo CHOP representan la pauta de quimioterapia utilizada con mayor frecuencia.

7.1. Rituximab

El anticuerpo monoclonal anti-CD20 se ha utilizado como monoterapia en el LCM tanto en primera línea como en el tratamiento de recidivas, con una tasa de respuestas del 27-38% y menos de un 5% de RC.³³³⁻³³⁵ Por el contrario, su utilización en combinación con regímenes de poliquimioterapia para la inducción a la remisión ha permitido incrementar notablemente la tasa de respuestas globales y RC, por lo que actualmente forma parte de la mayoría de esquemas terapéuticos.³³⁶ Sin embargo, esta elevada tasa de respuestas no se ha traducido, hasta el momento, en una mejoría de la SG de los pacientes.

7.2. Regímenes de poliquimioterapia

Existen numerosas pautas de quimioterapia utilizadas en el tratamiento del LCM que, en general, pueden agruparse en tres categorías: regímenes estándar con antraciclinas (R-CHOP; rituximab, ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona), esquemas intensivos que contienen antimetabolitos (R-HyperCVAD; rituximab, ciclofosfamida, vincristina, adriamicina, dexametasona, citarabina y metotrexato) y regímenes que incluyen análogos de las purinas.

7.2.1. R-CHOP

Según las diversas series publicadas, el tratamiento con R-CHOP consigue una tasa de respuestas globales superior al 95%³³⁶ y completas de entre el 34% y el 48%.^{336,337} El beneficio del rituximab fue confirmado en un estudio randomizado llevado a cabo por el grupo cooperativo alemán en el cual 122 pacientes con LCM en estadio III-IV recibieron de manera aleatorizada CHOP o R-CHOP.³³⁷ Los pacientes tratados con R-CHOP presentaron una mayor tasa de respuestas globales (94% vs. 75%) y RC (34% vs. 7%) y un mayor tiempo hasta la progresión (21 vs. 14 meses), aunque no se observaron diferencias en términos de supervivencia.

7.2.2. R-HyperCVAD

Diversos grupos han obtenido buenos resultados con la utilización de citarabina a altas dosis. En la serie publicada por Lefrere y cols., más del 80% de los pacientes tratados alcanzaron la RC.³³⁸ En el estudio llevado a cabo por el grupo del *M.D. Anderson Cancer Center* en 97 pacientes recién diagnosticados de LCM, la administración de R-HyperCVAD alternando con rituximab y altas dosis de metotrexato y citarabina consiguió una tasa de respuestas del 97% y un 87% de RC, así como un marcado aumento en la SLP y en la SG (64% y 82%, respectivamente).³³⁹ La mortalidad fue del 8% y se relacionó con la toxicidad aguda observada principalmente tras la

administración de citarabina y metotrexato así como con el desarrollo de síndromes mielodisplásicos (3 pacientes) y leucemia aguda (1 enfermo). El mismo esquema terapéutico con dosis matizadas de citarabina ha demostrado ser de utilidad en pacientes mayores de 65 años.³⁴⁰ Estos excelentes resultados no han sido confirmados en estudios aleatorizados.

7.2.3. Análogos de las purinas

Un estudio aleatorizado llevado a cabo recientemente por el grupo alemán ha demostrado la superioridad de la adición del rituximab al esquema FCM (fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrona) en pacientes con LCM previamente tratados.³⁴¹ Así, además de aumentar la tasa de respuestas y de RC, la administración de R-FCM incrementó de manera significativa la SG de estos pacientes.

Los análogos de las purinas son, asimismo, activos en el LCM como monoterapia, tanto en pacientes de diagnóstico reciente como en enfermos previamente tratados. La tasa de respuestas obtenida con fludarabina se sitúa entre el 33% y el 41%.^{342,343} Este porcentaje aumenta hasta el 63% en tratamientos combinados con ciclofosfamida.³⁴⁴ La 2-clorodeoxiadenosina (2-CDA) ha mostrado una tasa de respuestas del 81% utilizada como agente único, que llega a ser del 100% si se combina con mitoxantrona.^{345,346}

7.3. Radioinmunoterapia

Existen muy pocos estudios sobre la utilidad de la radioinmunoterapia (RIT) en el LCM. Globalmente, la tasa de respuestas alcanzadas con ⁹⁰Y-ibritumomab o ¹³¹I-tositumomab en monoterapia es similar a la conseguida con rituximab.³⁴⁷ La tendencia actual es utilizar la RIT en combinación con quimioterapia como parte del tratamiento de inducción o como tratamiento de consolidación.³⁴⁸ Así, los resultados preliminares en pacientes con LCM refractario o en recaída muestran una tasa de respuestas de alrededor del 40% aunque con una SLP inferior a 6 meses.

7.4. Trasplante de progenitores hematopoyéticos

El trasplante de progenitores hematopoyéticos ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de los pacientes con LCM, con resultados variables.³⁴⁹

7.4.1. Trasplante autólogo

La administración de quimioterapia a altas dosis seguida de trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos ha sido utilizada por diversos grupos en el tratamiento del LCM con resultados variables debido fundamentalmente a las diferencias respecto al momento de la realización del

trasplante y a diferentes criterios de selección de los pacientes.³⁵⁰⁻³⁵⁶ El *European MCL Network* ha demostrado recientemente el beneficio del trasplante autólogo (RC, 81%) respecto del mantenimiento con α -interferón (RC, 37%) en pacientes con LCM en primera remisión tras quimioterapia de inducción de tipo CHOP.³⁵¹ La SLP resultó, asimismo, significativamente superior en el grupo de pacientes que tratados con trasplante autólogo (mediana de 39 meses y 17 meses, respectivamente). Al igual que en estudios previos, el grupo de pacientes que obtuvo mayores beneficios del trasplante fue el que se encontraba en RC en el momento del procedimiento.^{350,353} A pesar de los buenos resultados observados, en la mayoría de estudios el trasplante autólogo no aumenta de manera significativa la supervivencia de los pacientes con LCM.

7.4.2. Trasplante alogénico

En la actualidad, el trasplante alogénico es el único tratamiento con potencial curativo en el LCM. En algunos estudios este procedimiento parece mejorar el pronóstico de los enfermos al prolongar la duración de la respuesta obtenida, incluso en pacientes en recaída tras trasplante autólogo,³⁵⁷⁻³⁵⁹ consiguiendo, además, un porcentaje no despreciable de RC moleculares. Por el contrario, otros estudios no han observado diferencias significativas al comparar el trasplante autólogo con el alogénico.^{360,361} En el análisis realizado por Ganti y cols.³⁶⁰ el subgrupo de pacientes que obtuvo mayores beneficios

del trasplante fue el que había recibido quimioterapia previa con HyperCVAD con o sin rituximab, de manera similar a lo observado por Khouri y cols.³⁶² En cuanto a la SG, la mayoría de grupos no han observado diferencias significativas respecto al trasplante autólogo, ya que aunque el trasplante alogénico aumenta la SLP al disminuir la tasa de recaídas también presenta una mayor mortalidad asociada al procedimiento.

La edad avanzada que presentan la mayoría de los pacientes afectados de LCM ha impulsado el desarrollo del trasplante alogénico con regímenes de acondicionamiento no mieloablativos.³⁶³⁻³⁶⁵ En el estudio publicado por Maris y cols., 33 pacientes con LCM refractario o en recaída fueron sometidos a trasplante alogénico (en 17 casos de donante no emparentado) tras acondicionamiento no mieloablativo con fludarabina e irradiación corporal total.³⁶⁵ En 31 casos se consiguió un injerto estable. La tasa de respuestas globales fue del 85% y únicamente un paciente presentó una recidiva del LCM tras una mediana de seguimiento de 24 meses. La elevada tasa de respuestas y el escaso número de recidivas observadas parecen relacionarse con la existencia de un efecto del injerto contra el linfoma, ya sugerido anteriormente ante la evidencia de remisiones moleculares tras la realización de trasplantes alogénicos convencionales.³⁵⁷

7.5. Nuevas modalidades terapéuticas

7.5.1. Bortezomib

El efecto antitumoral del bortezomib implica numerosos mecanismos, tales como la inhibición de la progresión del ciclo celular, la inducción de apoptosis, el bloqueo de NF- κ B y la inhibición de la angiogénesis.³⁶⁶ Además de inhibir la expresión constitutiva de NF- κ B, el bortezomib inhibe la expresión de ciclina D1.³⁶⁷ Asimismo, da lugar a una sobreexpresión de la proteína proapoptótica NOXA, que interacciona con MCL-1 y favorece la liberación de BAK, ocasionando la muerte celular por apoptosis.²³³ Recientemente se ha demostrado la actividad de este inhibidor del proteasoma en pacientes afectados de LCM refractario o en recaída, con una tasa de respuestas entre el 33% y el 50% y una duración de la respuesta de 9 meses.³⁶⁸⁻³⁷¹ Con el objetivo de mejorar estos resultados, en la actualidad se están llevando a cabo diferentes estudios con bortezomib en combinación con diversos fármacos citotóxicos y rituximab como tratamiento de primera línea y en pacientes con LCM en recaída o refractario. En este sentido, los resultados preliminares obtenidos *in vitro* e *in vivo* son prometedores.^{372,373}

7.5.2. Talidomida

La talidomida se ha utilizado en el tratamiento del LCM en un intento de modular las interacciones que tienen lugar entre las células del estroma y las células B normales y tumorales. La talidomida ha mostrado su actividad en monoterapia en el LCM en recaída^{374,375} y recientemente se ha demostrado la existencia de un efecto aditivo/sinérgico con rituximab en pacientes con LCM en recidiva o refractario.³⁷⁶ En estos pacientes, la tasa de respuestas globales fue de 81%, el 31% de enfermos alcanzó la RC y la SLP fue de 20 meses.

7.5.3. Gemcitabina

La gemcitabina es un análogo de las purinas que ha demostrado actividad en monoterapia en pacientes con LCM en recaída o refractario.³⁷⁷ Recientemente se ha analizado la actividad de la gemcitabina administrada junto con dexametasona y cisplatino.³⁷⁸ Este régimen ha conseguido una tasa de respuestas globales del 45% con una duración de la respuesta de 8,5 meses.

7.5.4. Flavopiridol

El flavopiridol es un inhibidor de CDK e induce, asimismo, una disminución en los niveles de expresión de las ciclinas D1 y D3, hechos que

constituyen la base para su utilización en el LCM.³⁷⁹ En el único estudio clínico realizado hasta el momento en pacientes con LCM, la administración de flavopiridol tres veces por semana cada 3 semanas mostró únicamente una modesta actividad, con un 11% de respuestas parciales (observadas en pacientes previamente no tratados) y con una duración de la respuesta de tan sólo 3 meses.³⁸⁰ La administración de flavopiridol en infusión continua de 72 horas no resultó de mayor eficacia.³⁸¹

7.5.5. Inhibidores de mTOR (*mammalian target of rapamycin*)

mTOR es una proteín-quinasa que regula la traducción del ARNm de ciclina D1 a través de la fosforilación de dos sustratos fundamentales, eIF4E (*eukariotic initiation factor 4E binding protein*) y la quinasa p70S6. La actividad de mTOR está modulada por diversos estímulos transmitidos por diferentes vías de transducción de señales en las que participan Akt y PI3K, entre otras. La función de mTOR se encuentra, asimismo, modulada por la rapamicina y sus derivados. De este modo, el efecto inmunosupresor y antineoplásico de la rapamicina es debido a su unión a mTOR en un lugar próximo a su centro catalítico y a la consiguiente inhibición de la fosforilación de sus sustratos. La actividad de mTOR puede ser inhibida por análogos de la rapamicina como el temsirolimus.

El temsirolimus (CCI-779), un dihidroéster de la rapamicina, ha sido utilizado en diversos estudios realizados en tumores sólidos como potencial agente antineoplásico. Recientemente se ha publicado un estudio llevado a cabo en pacientes con LCM en recidiva o refractarios tratados con temsirolimus en monoterapia con el objetivo de determinar si la acción específica sobre la regulación de ciclina D1 es capaz de inducir respuesta antitumoral en estos pacientes.³⁸² La tasa de respuestas observada en 34 pacientes fue del 38%, con una duración de la respuesta de 6,5 meses. No obstante, la tasa de respuestas observada con temsirolimus es similar a la observada con otros fármacos como el rituximab o el bortezomib en monoterapia.

8. FACTORES PRONÓSTICOS

La supervivencia mediana de los pacientes diagnosticados de LCM es, aproximadamente, de entre 3 y 5 años, aunque algunos enfermos presentan un curso clínico muy agresivo y fallecen en menos de un año mientras que otros sufren formas de LCM relativamente indolentes y presentan supervivencias de más de 10 años.

Los principales factores clínicos con importancia pronóstica desfavorable en el LCM son la edad avanzada, el mal estado general, la presencia de esplenomegalia, la anemia y la cifra elevada de LDH sérica.^{27,28,32,36,44,46,47,317,383,384} Recientemente se ha descrito el MIPI (*mantle cell lymphoma international prognostic index*), basado en cuatro factores pronósticos independientes (edad, ECOG, cifra de LDH y recuento leucocitario).³⁸⁵ Este índice pronóstico, el primero diseñado específicamente para el LCM, permite clasificar a los pacientes en tres grupos de riesgo con distinta supervivencia de manera más precisa que el IPI y el FLIPI, desarrollados para el LDCG-B y el LF, respectivamente. La presencia de expresión hemoperiférica ha demostrado tener implicación pronóstica en algunos estudios.^{28,44,46,383,384} Los datos existentes en cuanto al valor pronóstico de datos morfológicos como la citología o el patrón de crecimiento son contradictorios.^{27,28,34,36,46,386} Varios estudios han confirmado el pronóstico desfavorable de las mutaciones de *TP53*.^{81,82,164,387} Sin embargo, el factor pronóstico biológico más importante es el índice proliferativo determinado

por el número de mitosis o por la positividad de Ki-67.^{27,28,44,386,388,389} Así, en la serie publicada por Bosch y cols., los pacientes con ≥ 2.5 mitosis/campo gran aumento presentaron una supervivencia mediana de 24 meses, mientras que en aquellos enfermos con ≤ 2.5 mitosis/campo gran aumento la supervivencia mediana fue de 50 meses.⁴⁴ De manera similar, en un estudio retrospectivo realizado en 300 pacientes, el índice proliferativo resultó ser el marcador pronóstico más relevante, claramente superior a los parámetros clínicos y cito-histológicos.²⁷

Estos resultados han sido confirmados en estudios de expresión génica, que han identificado los marcadores de proliferación celular como los de mayor relevancia en el LCM.⁶⁹ En este sentido, el patrón de genes relacionados con la proliferación tumoral se considera actualmente el principal factor predictivo de supervivencia. Este patrón constituye la integración cuantitativa de diversos fenómenos oncogénicos mediante la utilización de un grupo de genes asociados a proliferación celular. Ello ha permitido la mejor caracterización de diferentes subgrupos de pacientes con LCM en los cuales la mediana de supervivencia difiere en más de 5 años.

Recientemente se ha descrito, asimismo, que las ganancias de 3q27-qter y las pérdidas de 9q21-q32 tienen un valor pronóstico independiente del perfil de expresión génica relacionado con la proliferación tumoral.³⁹⁰ Cabe destacar que estas alteraciones influyen la evolución del LCM en distintos subtipos de pacientes de manera preferente. Así, las ganancias de 3q tienen

importancia pronóstica principalmente en el grupo de pacientes con baja proliferación tumoral mientras que las pérdidas de 9q la tienen fundamentalmente en el grupo con proliferación elevada.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El LCM es una entidad clínica y biológica bien definida. Sin embargo, el LCM presenta una gran variabilidad tanto en su comportamiento clínico como en la respuesta a los diferentes tratamientos. La existencia de pacientes resistentes al tratamiento de primera línea, así como la elevada tasa de recaídas y progresiones en los enfermos con buena evolución inicial, sugieren que, de manera análoga a otros SLPC-B, existen alteraciones en los mecanismos de citotoxicidad inducida por fármacos. La heterogeneidad en el comportamiento clínico del LCM queda reflejada, entre otros, por la variabilidad en la presentación de expresión hemoperiférica e infiltración del SNC, dos complicaciones controvertidas y no suficientemente estudiadas.

Con todos estos datos, la hipótesis planteada fue que la heterogeneidad a la respuesta al tratamiento observada en el LCM podría deberse a la existencia de alteraciones en los mecanismos de apoptosis en un subgrupo de pacientes. Por otro lado, el análisis exhaustivo de los enfermos que presentan expresión hemoperiférica o infiltración del SNC permitiría establecer cuáles son las características clínicas y biológicas que determinan la aparición de estas complicaciones en determinados pacientes.

OBJETIVOS

1. Estudiar las bases moleculares de la regulación de la apoptosis en el LCM, tanto en líneas celulares como en células primarias.
 - 1.1. Identificar el tipo de caspasas que intervienen en el proceso apoptótico.
 - 1.2. Analizar el papel de las proteínas de la familia de BCL-2 en la apoptosis de las células del LCM e identificar posibles diferencias con otros SLPC-B.
 - 1.3. Caracterizar los mecanismos de inducción de apoptosis por diferentes fármacos citotóxicos (fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrona).

2. Analizar la incidencia de la expresión hemoperiférica en los pacientes afectados de LCM mediante citología y citometría de flujo.
 - 2.1. Correlacionar la existencia de leucemización con las características clínicas y determinar su impacto pronóstico.
 - 2.2. Correlacionar la existencia de leucemización con las posibles anomalías genéticas evidenciadas mediante CGH.

3. Estudiar la incidencia y los factores determinantes de la infiltración del SNC en pacientes con LCM.

3.1. Analizar las características clínicas, el tratamiento y la evolución de los pacientes que desarrollan infiltración neurológica.

III. RESULTADOS

1. PRIMER TRABAJO

1.1. RESUMEN

Activación de la vía mitocondrial de apoptosis en el linfoma de células del manto: elevada sensibilidad a la mitoxantrona en los casos con genes de respuesta a daño al ADN funcionales.

El LCM es una proliferación de células B maduras caracterizado por la presencia de la translocación t(11;14)(q13;q32) y la sobreexpresión de la proteína ciclina D1. Desde un punto de vista clínico, el LCM presenta un curso agresivo y mala respuesta a la quimioterapia convencional en relación a la existencia de resistencias primarias al tratamiento o por el desarrollo de recidivas tras una respuesta inicial de breve duración. La mayoría de los fármacos utilizados habitualmente en el tratamiento de los SLPC-B ocasionan la muerte de las células tumorales mediante la inducción de apoptosis. Sin embargo, en el caso del LCM existen muy pocos datos al respecto. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de apoptosis inducida por fármacos en esta entidad.

Se analizaron los mecanismos de muerte celular en cuatro líneas celulares portadoras de la t(11;14)(q13;q32) y en células primarias de 10 pacientes diagnosticados de LCM mediante su incubación *in vitro* con diferentes fármacos utilizados habitualmente en el tratamiento de los SLPC-B.

La mitoxantrona, un inhibidor de la topoisomerasa II, fue el fármaco que ocasionó el mayor efecto citotóxico en tres líneas celulares (JVM-2, REC-1 y Granta 519) y en las células de LCM de todos los pacientes estudiados. Esta citotoxicidad fue debida a la inducción de apoptosis y se observó incluso en presencia de alteraciones de *TP53* o de *ATM*. Así, la incubación con fármacos citotóxicos ocasionó una pérdida del potencial transmembrana mitocondrial, cambios conformacionales de BAX y BAK, activación de caspasa 9 y, secundariamente, de caspasa 8, e inducción de apoptosis. Se detectó, asimismo, una disminución en los niveles de expresión de MCL-1, BCL-X_L y XIAP. Por el contrario, no se observó ningún efecto citotóxico en la línea celular NCEB-1, portadora de anomalías de *TP53* y de *ATM*, a pesar de disponer de una maquinaria apoptótica funcional, como se observó al incubar células de esta línea con estaurosporina, un potente inductor de apoptosis por acción directa sobre la mitocondria.

Estos resultados demuestran que las células del LCM presentan una vía mitocondrial de apoptosis funcional y sugieren que únicamente las células con disfunción simultánea de *TP53* y *ATM* son resistentes a las señales de apoptosis inducidas por el daño genómico.

ORIGINAL PAPER

Activation of mitochondrial apoptotic pathway in mantle cell lymphoma: high sensitivity to mitoxantrone in cases with functional DNA-damage response genes

Ana Ferrer^{1,4}, Silvia Marcé^{2,4}, Beatriz Bellosillo^{2,5}, Neus Villamor², Francesc Bosch¹, Armando López-Guillermo¹, Blanca Espinet³, Francesc Solé³, Emili Montserrat¹, Elias Campo² and Dolors Colomer^{*2}

¹Department of Hematology, Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Spain; ²Department of Pathology, Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Spain; ³Laboratory of Cytogenetics and Molecular Biology, Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

Mantle cell lymphoma (MCL) is a mature B-cell proliferation characterized by the presence of translocation t(11;14)(q13;q32), an aggressive clinical course, and poor response to chemotherapy. The majority of drugs currently used in the treatment of lymphoproliferative disorders induce cell death by triggering apoptosis, but few data concerning drug-induced apoptosis in MCL have been reported. We have analysed the mechanisms of drug-induced cell death in four cell lines with the t(11;14) and in primary cells from 10 patients with MCL. Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induced a strong cytotoxic effect in three cell lines (JVM-2, REC-1, and Granta 519), and in primary MCL cells. This cytotoxic effect due to apoptosis induction was observed despite the presence of either p53 or ATM abnormalities. However, no cytotoxic effect was detected after incubation with DNA-damaging agents in the NCEB-1 cell line, carrying p53 and ATM alterations, despite the presence of functional mitochondrial machinery. These results support that mitoxantrone can be effective in the treatment of MCL but that this activity requires the integrity of functional DNA-damage response genes.

Oncogene advance online publication, 11 October 2004; doi:10.1038/sj.onc.1208084

Keywords: apoptosis; lymphoma; mitoxantrone

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a lymphoproliferative disorder derived from a subset of naive pregerminal center cells with a mature B-cell phenotype and

coexpression of CD5 (Swerdlow *et al.*, 2001; Campo, 2003). MCL is characterized by the chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32) that results in cyclin D1 overexpression (Bosch *et al.*, 1994; Campo *et al.*, 1999; Bertoni *et al.*, 2004) with the consequent deregulation of cell cycle control at the G₁-S checkpoint. In addition to classical MCL, a blastoid variant of the disease has been described, which is characterized by high mitotic rate and that is associated with *INK4a/ARF* deletions, *p53* mutations, and complex karyotypes (Hernandez *et al.*, 1996; Pinyol *et al.*, 1997; Schlegelberger *et al.*, 1999).

MCL is characterized by an aggressive clinical course and poor response to conventional therapy due to either rapid relapse after an initial response or primary resistance to drugs (Argatoff *et al.*, 1997; Bosch *et al.*, 1998). The DNA damage response pathway plays a crucial role in the pathogenesis and clinical behavior of tumoral cells. The ataxia-telangiectasia-mutated (*ATM*) gene codifies for a protein involved in p53 phosphorylation in response to DNA damage, thus promoting cell cycle arrest and apoptosis (Banin *et al.*, 1998). *ATM* and *p53* alterations are associated with drug resistance in lymphoproliferative disorders. *ATM* inactivation is commonly observed in MCL patients (Camacho *et al.*, 2002) and *p53* alterations are associated with blastoid variants (Hernandez *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 2003). The mechanisms of resistance to chemotherapy in MCL are poorly understood. Experimental evidences demonstrate that most of the chemotherapeutic agents currently used exert their cytotoxic effects by inducing apoptosis. Moreover, recently it has been proposed that alterations in the apoptotic pathways may contribute to the development of MCL (Hofmann *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2003).

The aim of this study was to analyse the mechanisms of drug-induced apoptosis in MCL. Towards this end, four cell lines carrying the t(11;14)(q13;q32), as well as primary MCL cells, were incubated *in vitro* with several drugs currently used in the treatment of lymphoproliferative disorders and drug-induced cell death was characterized.

*Correspondence: D Colomer, Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; E-mail: dcolomer@clinic.ub.es

⁴These two authors contributed equally to this study.

⁵Present address: Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

Received 24 March 2004; revised 5 August 2004; accepted 6 August 2004

Results

Cytotoxic effect of fludarabine, mafosfamide, and mitoxantrone on cell lines

JVM-2, REC-1, Granta 519, and NCEB-1 cell lines were incubated for 24 and 48 h with different concentrations of fludarabine (1–10 $\mu\text{g/ml}$), mafosfamide (1–10 $\mu\text{g/ml}$), and mitoxantrone (0.05–0.5 $\mu\text{g/ml}$), and the cytotoxic effect of these drugs was measured by annexin V-FITC/PI staining. The LD₅₀ for mitoxantrone, fludarabine, and mafosfamide is shown in Table 1. Mitoxantrone induced the strongest cytotoxic effect in JVM-2, REC-1, and Granta 519 cell lines at concentrations lower than those achieved with the dose currently used in clinical practice (0.5 $\mu\text{g/ml}$). In contrast, pharmacological doses of fludarabine (1 $\mu\text{g/ml}$) and mafosfamide (1 $\mu\text{g/ml}$) were not able to induce a significant cytotoxicity on any of these cell lines. REC-1 was the unique cell line for which the LD₅₀ for mafosfamide was less than 10 $\mu\text{g/ml}$ whereas the LD₅₀ for fludarabine was lower than 10 $\mu\text{g/ml}$ only for Granta 519. No cytotoxic effect was observed after incubation of NCEB-1 cells with mitoxantrone, fludarabine, or mafosfamide, even when higher doses of these drugs were used (data not shown).

To study the possible additive or synergistic effect of these drugs, cells from the four cell lines were incubated during 24 h with 0.25 $\mu\text{g/ml}$ of mitoxantrone, in the presence or absence of 1 $\mu\text{g/ml}$ of fludarabine and/or 1 $\mu\text{g/ml}$ of mafosfamide. Although concentrations of fludarabine and mafosfamide corresponded to those used in the FCM regimen (fludarabine + cyclophosphamide + mitoxantrone) (Bellosillo *et al.*, 1999), mitoxantrone concentration was reduced from 0.5 to 0.25 $\mu\text{g/ml}$ due to the massive cytotoxic effect observed at 0.5 $\mu\text{g/ml}$. As shown in Granta 519 cell line (Figure 1), none of these combinations resulted in a significant increase of cytotoxicity to that observed with mitoxantrone alone. The same results were detected in JVM-2 and REC-1 cell lines (data not shown).

Drug-induced apoptosis on MCL cell lines

In order to determine whether the cytotoxic effect was due to induction of apoptosis, the role of caspases and the proteolytic cleavage of PARP were analysed. Cells from the four cell lines were incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ fludarabine and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ mitoxantrone. The decrease on cell viability correlated with loss of $\Delta\Psi_m$, and with

the detection of the active form of caspase-3 in Granta 519 (Figure 2a), JVM-2, and REC-1 cell lines. These results demonstrated that drug cytotoxicity was due to apoptosis induction. No changes in $\Delta\Psi_m$ or activation of caspase-3 were observed in NCEB-1 cells (Figure 2b).

To study the mechanisms leading to the activation of caspase-3, the proteolysis and subsequent activation of caspase-9 and -8 were analysed. Mitoxantrone and fludarabine induced processing of both proteases, as shown by the decrease of the procaspase-9 and -8 and the appearance of the intermediate cleavage product (43/41 kDa) of caspase-8. Activation of caspase-3 was also accompanied by proteolysis of PARP (Figure 2c). No activation of caspase-9, -8 or -3 or cleavage of PARP were detected in NCEB-1 cells (Figure 2d).

Apoptosis-related proteins in drug-induced cell death

Western blot analysis revealed that MCL cell lines expressed Bcl-2, Bax, Bak, Bcl-X_L, and Mcl-1 proteins. After incubation with 10 $\mu\text{g/ml}$ fludarabine and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ mitoxantrone, no changes in the overall protein levels of Bcl-2, Bax, and Bak were detected, whereas downregulation of Mcl-1 was observed in the sensitive cell lines. Furthermore, a minor decrease on Bcl-X_L expression was also detected. We also determined the behavior of some IAP (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) family members. A downregulation of XIAP protein was observed after drug incubation of sensitive cell lines, whereas no changes in the survivin levels were detected. No downregulation of any Bcl-2 family member or IAP protein was observed in NCEB-1 cell line (Figure 3a).

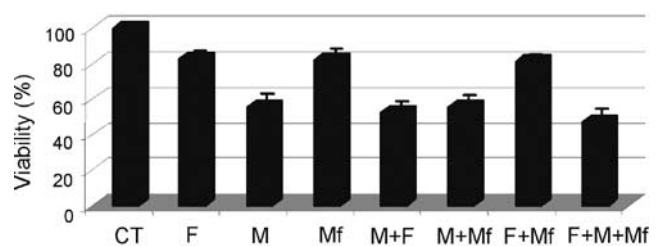


Figure 1 Cytotoxic effect of the combination of mitoxantrone with fludarabine and/or mafosfamide. Cells from Granta 519 cell line were incubated for 24 h in the absence of any factor (CT), with mitoxantrone alone (M; 0.25 $\mu\text{g/ml}$), and in combination with fludarabine (F; 1 $\mu\text{g/ml}$), and/or mafosfamide (Mf; 1 $\mu\text{g/ml}$). Cell viability was determined by annexin V binding as described in Materials and methods. Data are shown as the mean value \pm s.d. of triplicate cultures

Table 1 LD₅₀ for mitoxantrone (M), fludarabine (F), and mafosfamide (Mf) in MCL cell lines

	Drug ($\mu\text{g/ml}$) ^a			<i>p53/ATM status</i> ^b
	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>Mf</i>	
JVM-2	0.13 \pm 0.044	28.31 \pm 18.7	13.57 \pm 1.44	wt/wt
REC-1	0.17 \pm 0.025	12.41 \pm 4.93	5.48 \pm 0.64	wt/wt
GRANTA 519	0.23 \pm 0.004	8.55 \pm 4.46	12.42 \pm 3.31	wt/del
NCEB-1	NR ^c	NR ^c	NR ^c	del/del

^aData are shown as the LD₅₀ for each drug (mean \pm s.d.) ^b*p53* and *ATM* status assessed by FISH ^cNR: not reached

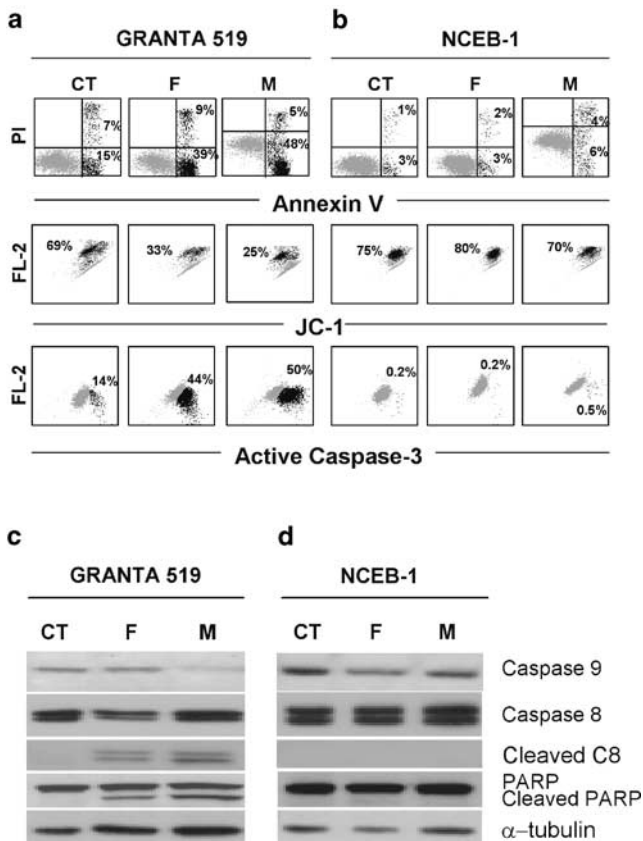


Figure 2 Activation of mitochondrial apoptotic pathway during drug-induced cell death. Cells from Granta 519 (a) and NCEB-1 (b) cell lines were incubated in the absence (CT) or presence of fludarabine (F; 10 $\mu\text{g/ml}$) or mitoxantrone (M; 0.25 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours. Cell viability was determined by annexin V binding. Changes in $\Delta\Psi_m$ were assessed by staining with JC-1. Active form of caspase-3 was quantified by anti-active caspase-3 immunostaining. In mitoxantrone-treated cells, a shift in the signal of fluorescence 3 (630 nm) was observed owing to the incorporation of this drug. The percentage of positive cells is indicated in each panel and represents cells undergoing apoptosis as assessed by the different methods of analysis. Whole-cell lysates were obtained from 2×10^6 cells from Granta 519 (c) and NCEB-1 (d) in the same conditions, and analysed by Western blot. Blots were also probed with α -tubulin antibody as an internal control

Involvement of Bax and Bak proteins in drug-induced apoptosis was also analysed using anti-Bax and -Bak antibodies directed against the NH₂-terminal region of both proteins. This region is occluded in unstressed intact cells and it is only available for binding to these antibodies following conformational changes of these proteins during the apoptotic process. An increase in the number of Bax and Bak-positive cells was detected in Granta 519 (Figure 3b), JVM-2, and REC-1 cells after incubation with 10 $\mu\text{g/ml}$ fludarabine and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ mitoxantrone. No changes in Bax and Bak conformation were observed in NCEB-1 cell line after incubation with these drugs.

Preincubation of Granta 519 cells with 200 μM Z-VAD.fmk, a broad inhibitor of caspases, reversed drug-induced phosphatidylserine exposure, loss of $\Delta\Psi_m$, and caspase-3 activation, thus confirming the role of

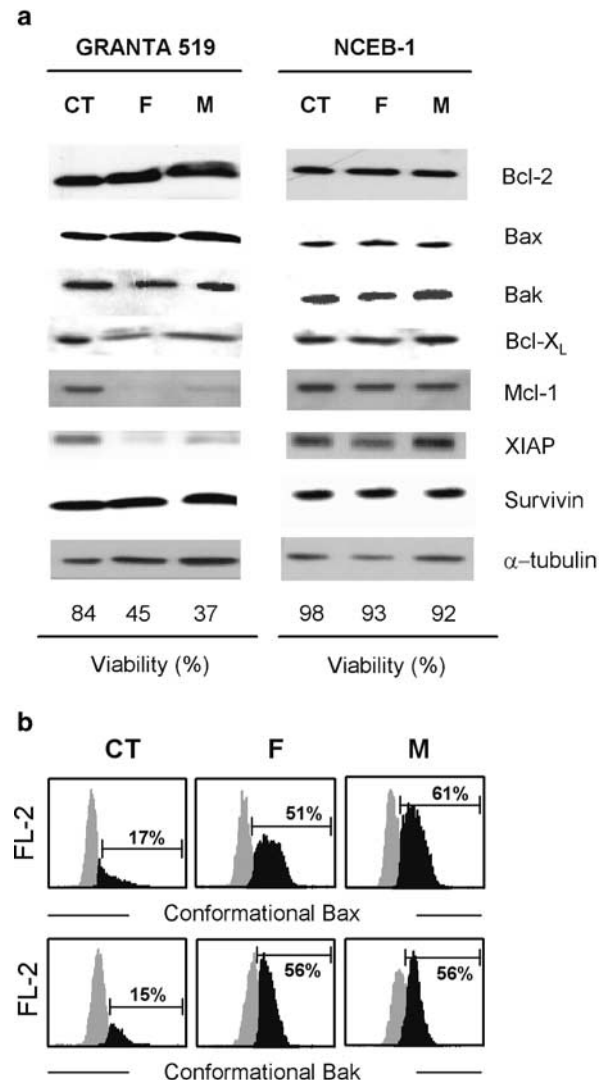


Figure 3 Apoptosis-related proteins in drug-induced apoptosis. (a) Whole-cell lysates were obtained from 2×10^6 cells from Granta 519 and NCEB-1 cell lines incubated for 24 h in the absence (CT) or presence of fludarabine (F; 10 $\mu\text{g/ml}$) or mitoxantrone (M; 0.25 $\mu\text{g/ml}$), and analysed by Western blot. Blots were also probed with α -tubulin antibody as an internal control. Cell viability is indicated as the percentage of annexin V negative cells analysed by flow cytometry. (b) Cells from Granta 519 cell line were incubated for 24 h in the absence (CT) or presence of fludarabine (F; 10 $\mu\text{g/ml}$) or mitoxantrone (M; 0.25 $\mu\text{g/ml}$). Bax and Bak conformational changes were determined by staining with anti-Bax and anti-Bak antibodies and flow cytometry analysis, as described in Material and methods. The percentage of positive cells is indicated in each panel

caspases in drug-induced cell death. In contrast, Bax and Bak conformational changes were observed despite inhibition of the caspase cascade, suggesting that these conformational changes occur upstream of the caspase activation or in a caspase-independent manner (data not shown).

Cell cycle analysis after drug exposure

The effect of mitoxantrone and fludarabine on cell cycle distribution and DNA content was analysed.

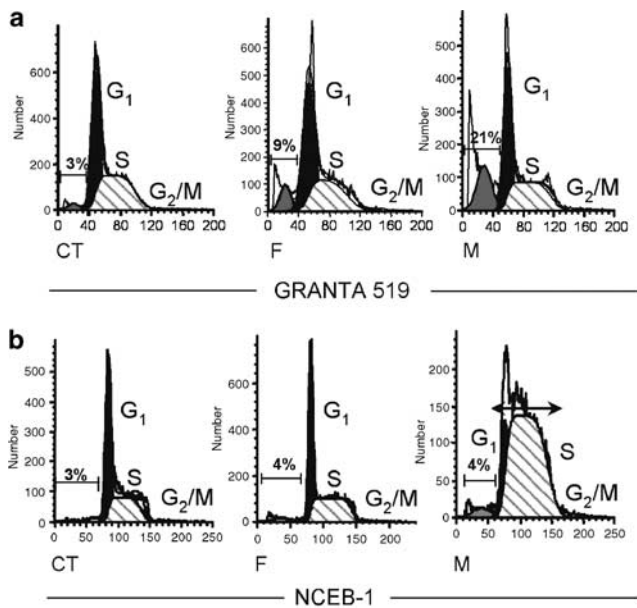


Figure 4 DNA content analysis after drug exposure. Cells from Granta 519 (**a**) and NCEB-1 (**b**) were incubated for 24 h with medium alone and in the presence of fludarabine (F; 10 μ g/ml) or mitoxantrone (M; 0.25 μ g/ml). DNA content was quantified by PI staining and flow cytometry analysis as described in Material and methods. NCEB-1 cell line displays a 4n DNA content, according to the nearly tetraploid karyotype observed by cytogenetic analysis

A sub-G₀/G₁ subpopulation corresponding to apoptotic cells was detected in Granta 519 (Figure 4a), JVM-2, and REC-1 cell lines, and progressively increased after 48–72 h incubation. NCEB-1 cells showed a 4n DNA content in agreement with the nearly tetraploid karyotype observed by cytogenetic analysis. After incubation with mitoxantrone, NCEB-1 exhibited a marked arrest in the transition from Sphase to G₂–M without apoptotic peak in the sub G₀/G₁ region, even when cell cycle analysis was performed at longer periods of time (48 and 72 h). No changes in the cell cycle pattern were detected after incubation of NCEB-1 cells with fludarabine (Figure 4b).

Staurosporine-induced apoptosis in NCEB-1 cells

To ascertain if the apoptotic machinery was functional in NCEB-1 cell line, cells were incubated with staurosporine, an inducer of mitochondrial apoptotic pathway (Xue *et al.*, 2003). After 24 h of drug exposure, a cytotoxic effect in NCEB-1 cells was observed. This effect was accompanied by loss of $\Delta\Psi_m$, activation of caspase-3, and conformational changes of Bax and Bak, demonstrating an efficient mitochondrial apoptotic machinery in this cell line (Figure 5).

Drug-induced apoptosis in cells from MCL patients

Tumoral cells from 10 MCL patients were incubated with mitoxantrone, mafosfamide, and fludarabine at the previously mentioned concentrations. The characteristics of these patients are summarized in Table 2. The 17p

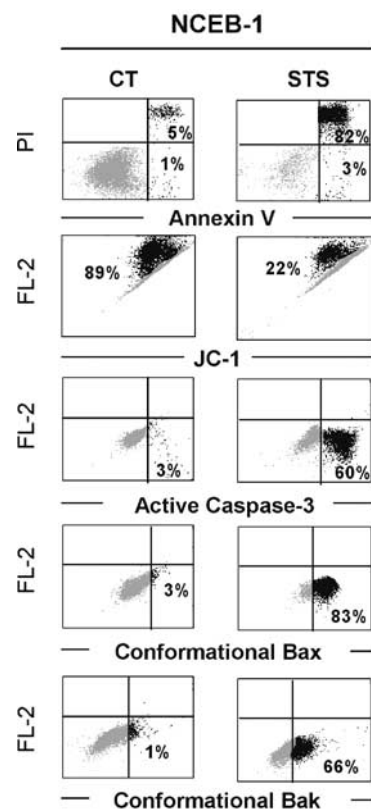


Figure 5 Staurosporine-induced apoptosis in NCEB-1 cells. Flow cytometry analysis of cell viability by annexin V binding, loss of $\Delta\Psi_m$ by JC-1 staining, active form of caspase-3, and conformational changes of Bax and Bak of a representative experiment. Cells from NCEB-1 cell line were incubated with medium alone (CT) or in the presence of staurosporine (STS; 5 μ M) for 24 h. The percentage of positive cells is indicated in each panel. All experiments were performed in triplicate

deletion by FISH and consequently *p53* mutations were detected in three cases. The deletion of *ATM* was detected in three additional patients. No cases lacking both *p53* and *ATM* were found. Pharmacological concentrations of mitoxantrone induced the strongest cytotoxic effect, being the median LD₅₀ for all the patients 0.37 μ g/ml (range 0.10–0.76 μ g/ml). A significant decrease in cell viability was also observed after incubation with mafosfamide 1 μ g/ml ($P=0.03$), although this effect was due to the cytotoxicity observed in only three out of the 10 MCL patients. The median LD₅₀ was 5.70 μ g/ml (range 2.6–11.5 μ g/ml). No cytotoxic effect was observed after incubation with fludarabine for 24 h, and only in one patient a significant cytotoxicity was detected after 48 h of incubation with high doses of this drug (5–10 μ g/ml) (data not shown).

The combination of pharmacological doses of mitoxantrone (0.5 μ g/ml) and mafosfamide (1 μ g/ml) had a significant additive effect ($P=0.04$) (Figure 6). However, using the method of Chou and Talalay (1984) this additive effect was only observed in cells from three MCL patients. No additive or synergistic effect was detected after the addition of fludarabine to this combination. The cytotoxic effect was accompanied by loss of $\Delta\Psi_m$, activation of caspase-9, -8, and -3, PARP

Table 2 Characteristics of MCL patients

Patient no.	Disease status	Cell source ^a	Morphologic variant ^b	% Tumoral cells	p53 status ^c	ATM status ^d	Mitoxantrone LD ₅₀ (µg/ml)
1	Diagnosis	PB	C	95	wt	Deleted	0.61
2	Diagnosis	PB	C	85	wt	wt	0.76
3	Diagnosis	Spleen	C	95	wt	Deleted	0.33
4	Diagnosis	PB	C	84	wt	Deleted	0.37
5	Relapse	PB	C	95	CGT → CAT Codon 273	wt	0.38
6	Diagnosis	Spleen	C	80	wt	wt	0.29
7	Diagnosis	PB	C	86	wt	wt	0.49
8	Relapse	PB	C	90	CGC → CCC Codon 72	wt	0.37
9	Relapse	PB	B	70	wt	wt	0.33
10	Relapse	Lymph nod	B	99	Mutated ^e	wt	0.10

^aSource of the cells used for the *in vitro* analysis. PB: peripheral blood. ^bC: classical, B: blastoid. ^cp53 status assessed by FISH and mutational status analysed by SSCP and sequencing. ^dATM status assessed by FISH. ^ePositive p53 staining by immunohistochemistry

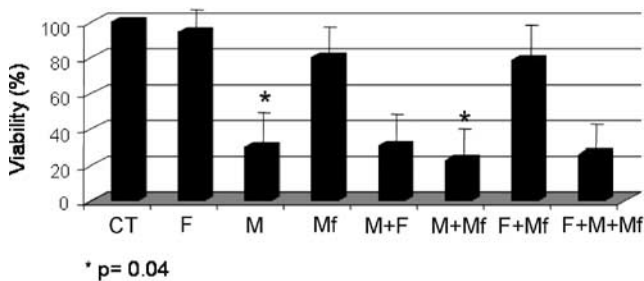


Figure 6 Cytotoxic effect of fludarabine, mitoxantrone, and mafosfamide alone or in combination in primary MCL cells. Lymphocytes from 10 MCL patients were incubated at 37°C for 24 h in the absence of any factor (CT), with pharmacological doses of fludarabine (F; 1 µg/ml), mitoxantrone (M; 0.5 µg/ml), and mafosfamide (Mf; 1 µg/ml), or with the combination of these drugs. Cell viability was determined by annexin V binding as described in Material and methods and is expressed as the percentage with respect to the viability of cells in medium alone at the beginning of the culture. Data are shown as the median value ± range

proteolysis, and conformational changes of Bax and Bak. Furthermore, downregulation of Mcl-1, Bcl-X_L, and XIAP was detected, whereas no changes in the overall protein levels of Bcl-2, Bax, and Bak were observed (Figure 7).

Discussion

MCL is an aggressive lymphoproliferative disorder highly resistant to currently available therapy. In fact, only few patients achieve a complete response and in most cases the prognosis is very poor (Argatoff *et al.*, 1997; Bosch *et al.*, 1998). Although the current therapy is based on the combination of several drugs, no data regarding the effect of conventional cytotoxic drugs alone or in combination on MCL primary cells have previously been reported. In this study, the cytotoxic effect of different drugs used in the treatment of lymphoproliferative disorders has been analysed in cells from MCL patients, as well as in cell lines carrying the t(11;14)(q13;q32).

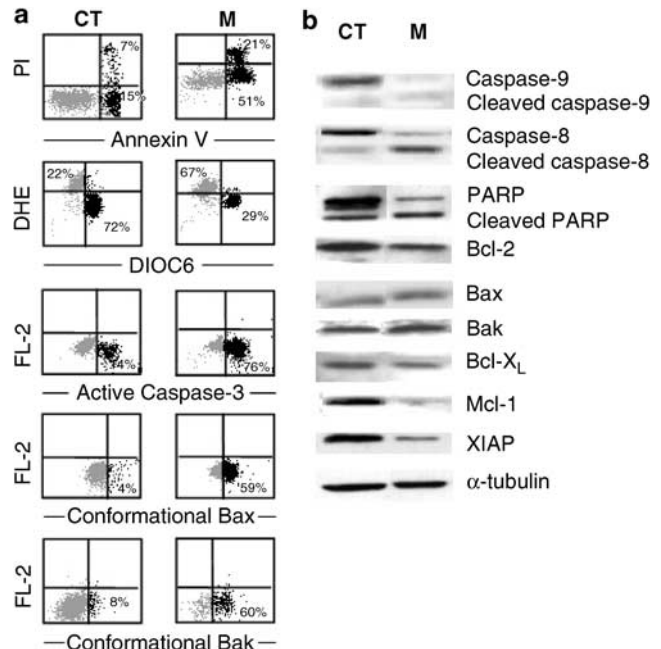


Figure 7 Drug-induced apoptosis in MCL primary cells. (a) Cells from a representative MCL patient were incubated with medium alone (CT) or in the presence of mitoxantrone (M; 0.5 µg/ml) for 24 h. Flow cytometric dot plots show cell viability as determined by annexin V binding, loss of ΔΨ_m by DiOC6 staining, quantification of active form of caspase-3, and Bax and Bak conformational changes, as described in Material and methods. In mitoxantrone-treated cells, a shift in the signal of fluorescence 3 (630 nm) was observed owing to the incorporation of this drug. The percentage of positive cells is indicated in each panel. (b) Whole-cell lysates were obtained from 2 × 10⁶ cells from the same patient incubated in the presence or absence (CT) of mitoxantrone (M; 0.5 µg/ml) for 24 h and analysed by Western blot. Blots were also probed with α-tubulin as an internal control

Our results demonstrate that mitoxantrone, an inhibitor of topoisomerase II, exerts the highest cytotoxic effect in three MCL cell lines (JVM-2, REC-1, and Granta 519) as well as in primary MCL cells from all patients tested. The LD₅₀ in these cases was lower than that previously observed in primary CLL cells (Bellosillo *et al.*, 1998).

Topoisomerase II inhibitors may act by interfering with the religation activity of the enzyme to DNA double-strand breaks. Several cell lines display natural resistance to mitoxantrone which is independent of drug transport and drug-target alterations (Bailly *et al.*, 1997). Furthermore, low expression of topoisomerase II is one of the mechanisms of resistance to topoisomerase II inhibitors (De Isabella *et al.*, 1991; Rasheed and Rubin, 2003). Thus, mitoxantrone rapidly induced apoptosis in sensitive cells, whereas it produced a G₂-M block in resistant ones. In agreement with these results, cell cycle analysis of NCEB-1 cell line revealed a G₂-M arrest in mitoxantrone- but not in fludarabine- or mafosfamide-treated cells. Recently, it has been described that topoisomerase II is one of the proliferation-related genes in MCL cells (Rosenwald *et al.*, 2003) and that topoisomerase-II α expression is a prognostic factor for clinical outcome in MCL (Schrader *et al.*, 2004). In this regard, our results demonstrate a high cytotoxic effect in MCL cell lines and primary cells from blastic MCLs, accordingly to their proliferative index.

Fludarabine, alone or in combination, has demonstrated efficacy in the treatment of CLL and follicular lymphoma (Solal-Celigny *et al.*, 1996; Flinn *et al.*, 2000; Bosch *et al.*, 2002). However, in our experience high doses of fludarabine were necessary to induce a minor cytotoxic effect on MCL cells *in vitro*. Recently, a case of a patient with MCL resistant to fludarabine has been reported, due to a deficient fludarabine uptake (Reiman *et al.*, 2002). In this regard, a relationship between *in vitro* sensitivity to fludarabine and drug uptake via equilibrative transport system has also been described in primary CLL cells (Molina-Arcas *et al.*, 2003).

In primary cells from three MCL patients, the combination of pharmacological doses of mitoxantrone and mafosfamide produced an additive cytotoxic effect. We had previously demonstrated that, in CLL cells, the combination of fludarabine with mafosfamide produced a significant synergistic effect, whereas the addition of mitoxantrone to this combination induced a significant increase in cytotoxicity only in previously treated CLL patients (Bellosillo *et al.*, 1999). The mechanism of the additive effect between mafosfamide and mitoxantrone in B-cell lymphoproliferative disorders could be related to the primary DNA damage produced by mafosfamide and the inability of the cellular machinery to repair it due to the mitoxantrone-mediated inhibition of topoisomerase II.

The present study demonstrates that cytotoxic drugs exert their effect by activating the mitochondrial apoptotic pathway in MCL cells. Thus, these drugs induced loss of mitochondrial transmembrane potential and conformational changes of Bax and Bak that triggered caspase-9 activation and apoptosis. Activation of caspase-8 was also observed and it could be explained by the occurrence of a loop involving caspase-9 and -3 or due to the involvement of other caspases upstream of mitochondria (Slee *et al.*, 1999). Inhibition of caspase activity using the pan-caspase inhibitor Z-VAD.fmk abolished the cleavage of caspase-3 and restored cell viability indicating that genotoxic-induced cell death in

MCL cells depends on caspase activity. As previously described (Bellosillo *et al.*, 2002), conformational changes of Bax and Bak were completely independent on caspase activation.

The Bcl-2 family of proteins plays a central role in controlling the apoptosis mitochondrial pathway (Cory and Adams, 2002; Cory *et al.*, 2003). In primary MCL cells as well as in MCL cell lines, conformational changes of Bax and Bak were detected after drug treatment and it was also accompanied by downregulation of Mcl-1 and Bcl-X_L. In this regard, downregulation of Mcl-1 has been described in CLL cells after several drug treatments (Bellosillo *et al.*, 1999) and, recently, a downregulation of Bcl-X_L after treatment of MCL cells with NF- κ B inhibitors has also been reported (Pham *et al.*, 2003). Furthermore, high expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1, and Bcl-X_L in NHL has been associated with chemotherapy resistance (Houry *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004). We have also detected a downregulation of XIAP, a member of the IAPs that inhibits the activity of caspases.

NCEB-1 was the unique cell line in which no cytotoxic effect was observed after incubation with genotoxic drugs, even when higher drug concentrations, longer incubation periods, and combination therapy were employed. In contrast, incubation of NCEB-1 cells with staurosporine induced the typical features of apoptosis, demonstrating that the mitochondrial apoptotic machinery is functional in NCEB-1 cells. The lack of response to genotoxic conventional drugs might be explained by the alteration of upstream regulators of Bcl-2 family proteins and/or in DNA damage response genes. In this regard, NCEB-1 cells showed a complex karyotype that included alterations in *p53* and *ATM*. These anomalies have also been found in patients with CLL and MCL and are associated with therapy failure and shorter survival (Wattel *et al.*, 1994; Dohner *et al.*, 1995; Hernandez *et al.*, 1996; Camacho *et al.*, 2002).

Apoptosis induced by genotoxic drugs is accompanied by the stabilization of *p53* after its phosphorylation by *ATM* (Banin *et al.*, 1998; Stankovic *et al.*, 2004). Since *p53*-mediated apoptosis is thought to underlie the cytotoxicity of most genotoxic drugs, and *ATM* mutations represent another potential mechanism of drug resistance, the simultaneous dysfunction of both *p53* and *ATM* might explain the failure in the induction of apoptosis in the NCEB-1 cell line. In accordance with this, no apoptosis was observed by topoisomerase I and II agents in *p53*-null mouse embryonic fibroblast with no *ATM* function (Fedier *et al.*, 2003). Recently, and in agreement with our results, an MCL cell line with alterations in both *p53* and *ATM* genes was completely resistant to apoptotic cell death although was highly sensitive to *in vitro* radiation. In contrast, a MCL cell line with only *p53* mutation underwent apoptosis (M'kacher *et al.*, 2003).

Our results demonstrate that MCL cells have a functional mitochondrial apoptotic machinery and suggested that cells lacking both *ATM* and *p53*, but not cells lacking one of these proteins, are resistant to genotoxic apoptotic stimuli. Finally, these *in vitro*

studies provide experimental support for including mitoxantrone in clinical trials.

Materials and methods

Cell lines

Cell lines carrying the t(11;14)(q13;q32) translocation were studied: Granta 519, NCEB-1, and REC-1 cell lines, all derived from MCL patients, and the JVM-2 cell line, derived from a B-prolymphocytic leukemia. Granta 519 and JVM-2 cell lines were purchased from the *DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (Braunschweig, Germany). NCEB-1 and REC-1 cell lines were kindly provided by Dr Niels S Andersen (Department of Hematology, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark) and Dr Christian Bastard (Department of Hematology, Centre Henri Becquerel, Rouen, France), respectively. *p53* mutations were detected in NCEB-1 cell line (Bogner *et al.*, 2003) and 11q alterations involving *ATM* in Granta 519 (Vorechovsky *et al.*, 1997) and NCEB-1. No *ATM* protein expression was detected by Western blot in these two cell lines (data not shown).

Patients

Ten patients diagnosed with MCL according to the World Health Organization classification (Swerdlow *et al.*, 2001) who had not received treatment for the previous 3 months were studied. Tumoral cells were obtained from peripheral blood in seven patients, splenic tissue in two, and lymph node in one. The percentage of malignant cells CD19+, CD5+, CD23-, and showing light chain restriction were analysed by flow cytometry. Cyclin D1 overexpression was demonstrated in all cases by immunohistochemistry. An informed consent was obtained from each patient in accordance with the Ethical Committee of the Hospital Clinic (Barcelona, Spain).

Isolation of MCL cells

Mononuclear cells from peripheral blood samples were isolated by Ficoll/Hypaque sedimentation (Seromed, Berlin, Germany). Tumoral cells were obtained after squirting lymph node or spleen biopsies with RPMI 1640 culture medium using a fine needle. Cells were either used directly or cryopreserved in liquid nitrogen in the presence of 10% dimethyl sulfoxide and 20% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco BRL, Paisley, Scotland). Manipulation due to freezing/thawing did not influence cell response.

Cell culture

JVM-2, REC-1, Granta 519, and NCEB-1 cell lines (0.5×10^6 /ml) and mononuclear cells from patients with MCL (1 to 5×10^6 /ml) were cultured in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine and 50 μ g/ml penicillin-streptomycin, at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide. Cells were incubated for 24–48 h with fludarabine monophosphate (Schering; Berlin, Germany), mitoxantrone (Lederle Laboratories; Gosport, Hampshire, UK), mafosfamide, the active form of cyclophosphamide (ASTAMedica; Frankfurt, Germany), and staurosporine (Sigma Chemicals; St Louis, MO). When Z-VAD.fmk (*N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone) (Bachem; Bubendorf, Switzerland) was employed, cells were preincubated for 1 h prior to the addition of drugs.

Antibodies

Monoclonal and polyclonal antibodies against active caspase-3, and Bax (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA); caspase-8, Bak (Ab-1), p53 (Ab-2), ATM (Ab-3) and α -tubulin (Oncogene Research, Boston, MA, USA); caspase-9 (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA); poly-adenosine diphosphate ribose polymerase (PARP) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany); Bcl-2 antibody (DAKO, Glostrup, Denmark); Mcl-1 (S-19) (Santa Cruz Biotechnology, CA); XIAP (Transduction Laboratories, Lexington, UK); survivin (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) and Bax (clone YTH-6A7) (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) were employed.

Cell viability by annexin V binding

Exposure of phosphatidylserine residues was quantified by surface annexin V staining as previously described (Bellosillo *et al.*, 2002). Experiments were performed in triplicate. LD₅₀ was defined for each drug as the concentration of drug required to reduce a 50% the cell viability.

Mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) and reactive oxygen species

Changes in $\Delta\Psi_m$ were evaluated by staining with 1 nM 3,3'-diethyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆[3]) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) or with 1.5 mM 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) (Molecular Probes). Reactive oxygen species (ROS) production was determined by staining with 2 μ M dihydroethidine (DHE) (Molecular Probes). Cells were incubated with dyes for 30 min at 37°C, washed, resuspended in PBS, and analysed by flow cytometry (Bellosillo *et al.*, 2001). A total of 10 000 cells per sample were acquired in a FACScan flow cytometer. Experiments were performed in triplicate.

Detection of intracellular proteins

Cells were fixed and permeabilized as previously described (Bellosillo *et al.*, 2002). Cells were stained with antibodies against the active form of caspase-3, Bax (0.25μ g/ml $\times 10^6$ cells), and Bak (2.5μ g/ml $\times 10^6$ cells) for 20 min at room temperature, followed by goat anti-rabbit-FITC (SuperTechs, Bethesda, MD, USA) or goat anti-mouse-FITC (DAKO), and analysed in a FACScan.

Western blot analysis was performed as previously described (Bellosillo *et al.*, 2002). Antibody binding was detected using a chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham, Buckinghamshire, UK). Equal protein loading was confirmed with α -tubulin blots.

Cell cycle analysis

Cells were fixed in 80% ethanol for 5 min at 5°C, centrifuged, and washed twice in PBS. Cells were incubated for 15 min at room temperature in a citrate-phosphate buffer (1:24), centrifuged, resuspended in 0.25 ml of PBS containing PI (5 μ g/ml) and Ribonuclease A (100 μ g/ml) (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA), and incubated for 10 min in the dark (Nicoletti *et al.*, 1991). The percentage of cells in G₀/G₁, S, G₂-M, and the presence of a sub-G₀/G₁ peak were evaluated with ModFit LT (Verity Software House, Inc., Topsham, MA, USA).

Fluorescence in situ hybridization

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed on fixed cells from the NCEB-1 cell line and from 10 patients with MCL. The LSI *p53* (17p13) SpectrumOrange-labeled and LSI

ATM (11q22.3) SpectrumGreen-labeled probes (Vysis, Downers Grove, IL) were tested. Two different observers scored 200 nuclei. A true deletion was considered when more than 5% of nuclei showed one hybridization signal. This threshold was established using fixed material from 10 normal subjects.

p53 molecular studies

p53 mutational analysis was performed in nine MCL patients. Exons 4–8 were amplified by PCR. Single-stranded conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing were performed as previously described (Pinyol et al., 2000).

References

- Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE and Gascoyne RD. (1997). *Blood*, **89**, 2067–2078.
- Bailey JD, Skladanowski A, Bettaieb A, Mansat V, Larsen AK and Laurent G. (1997). *Leukemia*, **11**, 1523–1532.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y and Ziv Y. (1998). *Science*, **281**, 1674–1677.
- Bellosillo B, Colomer D, Pons G and Gil J. (1998). *Br. J. Haematol.*, **100**, 142–146.
- Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Pons G, Montserrat E and Gil J. (1999). *Blood*, **94**, 2836–2843.
- Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Marce S, Esteve J, Campo E, Colomer D and Montserrat E. (2001). *Blood*, **98**, 2771–2777.
- Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Marce S, Bosch F, Campo E, Montserrat E and Colomer D. (2002). *Blood*, **100**, 1810–1816.
- Bertoni F, Zucca E and Cotter FE. (2004). *Br. J. Haematol.*, **124**, 130–140.
- Bogner C, Ringshausen I, Schneller F, Fend F, Quintanilla-Martinez L, Hacker G, Goetze K, Oostendorp R, Peschel C and Decker T. (2003). *Br. J. Haematol.*, **122**, 260–268.
- Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, Tassies D, Jaffe ES, Montserrat E and Rozman C. (1994). *Blood*, **84**, 2726–2732.
- Bosch F, Ferrer A, Lopez-Guillermo A, Gine E, Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Cobo F, Perales M, Esteve J, Altes A, Besalduch J, Ribera JM and Montserrat E. (2002). *Br. J. Haematol.*, **119**, 976–984.
- Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, Vallespi T, Woessner S and Montserrat E. (1998). *Cancer*, **82**, 567–575.
- Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, Tort F, Bellosillo B, Bea S, Bosch F, Montserrat E, Cardesa A, Fernandez PL and Campo E. (2002). *Blood*, **99**, 238–244.
- Campo E. (2003). *Hum. Pathol.*, **34**, 330–335.
- Campo E, Raffeld M and Jaffe ES. (1999). *Semin. Hematol.*, **36**, 115–127.
- Chou TC and Talalay P. (1984). *Adv. Enzyme Regul.*, **22**, 27–55.
- Cory S and Adams JM. (2002). *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 647–656.
- Cory S, Huang DC and Adams JM. (2003). *Oncogene*, **22**, 8590–8607.
- De Isabella P, Capranico G and Zunino F. (1991). *Life Sci.*, **48**, 2195–2205.
- Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J and Stilgenbauer S. (1995). *Blood*, **85**, 1580–1589.
- Fang NY, Greiner TC, Weisenburger DD, Chan WC, Vose JM, Smith LM, Armitage JO, Mayer RA, Pike BL, Collins FS and Hacia JG. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5372–5377.
- Fedier A, Schlamming M, Schwarz VA, Haller U, Howell SB and Fink D. (2003). *Ann. Oncol.*, **14**, 938–945.
- Flinn IW, Byrd JC, Morrison C, Jamison J, Diehl LF, Murphy T, Piantadosi S, Seifter E, Ambinder RF, Vogelsang G and Grever MR. (2000). *Blood*, **96**, 71–75.
- Hernandez L, Fest T, Cazorla M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, Piris MA, Montserrat E, Cardesa A, Jaffe ES, Campo E and Raffeld M. (1996). *Blood*, **87**, 3351–3359.
- Hofmann WK, De Vos S, Tsukasaki K, Wachsmann W, Pinkus GS, Said JW and Koeffler HP. (2001). *Blood*, **98**, 787–794.
- Khoury JD, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, McDonnell TJ, Abruzzo LV and Lai R. (2003). *J. Pathol.*, **199**, 90–97.
- M'kacher R, Bennaceur A, Farace F, Lauge A, Plassa LF, Wittmer E, Dossou J, Violot D, Deutsch E, Bourhis J, Stoppa-Lyonnet D, Ribrag V, Carde P, Parmentier C, Bernheim A and Turhan AG. (2003). *Oncogene*, **22**, 5961–5968.
- Martinez N, Camacho FI, Algara P, Rodriguez A, Dopazo A, Ruiz-Ballesteros E, Martin P, Martinez-Climent JA, Garcia-Conde J, Menarguez J, Solano F, Mollejo M and Piris MA. (2003). *Cancer Res.*, **63**, 8226–8232.
- Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, Montserrat E, Gil J, Colomer D and Pastor-Anglada M. (2003). *Blood*, **101**, 2328–2334.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F and Riccardi C. (1991). *J. Immunol. Methods*, **139**, 271–279.
- Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P and Ford RJ. (2003). *J. Immunol.*, **171**, 88–95.
- Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, Balbin M, Jares P, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, Lopez-Otin C and Campo E. (1997). *Blood*, **89**, 272–280.
- Pinyol M, Hernandez L, Martinez A, Cobo F, Hernandez S, Bea S, Lopez-Guillermo A, Nayach I, Palacin A, Nadal A, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A and Campo E. (2000). *Am. J. Pathol.*, **156**, 1987–1996.
- Rasheed ZA and Rubin EH. (2003). *Oncogene*, **22**, 7296–7304.
- Reiman T, Graham KA, Wong J, Belch AR, Coupland R, Young J, Cass CE and Mackey JR. (2002). *Leukemia*, **16**, 1886–1887.
- Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, Gascoyne RD, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Chiorazzi M, Giltman JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Henrickson S, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Montserrat E, Bosch F, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Holte H, Delabie J and Staudt LM. (2003). *Cancer Cell*, **3**, 185–197.
- Schlegelberger B, Zwingers T, Harder L, Nowotny H, Siebert R, Vesely M, Bartels H, Sonnen R, Hopfinger G, Nader A, Ott G, Muller-Hermelink K, Feller A and Heinz R. (1999). *Blood*, **94**, 3114–3120.

Statistical analysis

Comparisons were performed by using the Mann–Whitney test as appropriate. A *P*-value <0.05 was considered to be statistically significant.

Acknowledgements

This work was supported in part by Grants FIS 02/250, 03/0398, CICYT SAF 02/3261, and Red Estudio neoplasias Linfoides G03/179. AF had a fellowship from Hospital Clinic.

- Schrader C, Meusers P, Brittinger G, Teymoortash A, Siebmann JU, Janssen D, Parwaresch R and Tiemann M. (2004). *Leukemia*, **18**, 1200–1206.
- Slee EA, Adrain C and Martin SJ. (1999). *Cell Death. Differ.*, **6**, 1067–1074.
- Solal-Celigny P, Brice P, Brousse N, Caspard H, Bastion Y, Haioun C, Bosly A, Tilly H, Bordessoule D, Sebban C, Harousseau JL, Morel P, Dupas B, Plassart F, Vasile N, Fort N and Lepage M. (1996). *J. Clin. Oncol.*, **14**, 514–519.
- Stankovic T, Hubank M, Cronin D, Stewart GS, Fletcher D, Bignell CR, Alvi AJ, Austen B, Weston VJ, Fegan C, Byrd PJ, Moss PA and Taylor AM. (2004). *Blood*, **103**, 291–300.
- Swerdlow SH, Berger F, Isaacson P, Muller-Hermelink HK, Nathwani BN, Piris MA and Harris NL. (2001). *Pathology & Genetics. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* Jaffe ES, Harris NL, Stein H and Vardiman JW (ed). IARC press. Lyon, 168–170.
- Vorechovsky I, Luo L, Dyer MJ, Catovsky D, Amlot PL, Yaxley JC, Foroni L, Hammarstrom L, Webster AD and Yuille MA. (1997). *Nat. Genet.*, **17**, 96–99.
- Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, Morel P and Fenaux P. (1994). *Blood*, **84**, 3148–3157.
- Xue LY, Chiu SM and Oleinick NL. (2003). *Exp. Cell Res.*, **283**, 135–145.
- Zhao WL, Daneshpouy ME, Mounier N, Briere J, Leboeuf C, Plassa LF, Turpin E, Cayuela JM, Ameisen JC, Gisselbrecht C and Janin A. (2004). *Blood*, **103**, 695–697.

2. SEGUNDO TRABAJO

2.1. RESUMEN

La expresión hemoperiférica es un hecho prácticamente constante en el linfoma de células del manto.

La incidencia de expresión hemoperiférica en los pacientes diagnosticados de LCM oscila entre 13% y 77%, según las distintas series publicadas. Los motivos de esta discrepancia podrían ser debidos a sesgos en la selección de pacientes y a los distintos criterios morfológicos e inmunofenotípicos utilizados para definir la existencia de leucemización. El valor pronóstico de la expresión hemoperiférica en el LCM es controvertido, y su presencia se ha asociado a una supervivencia inferior en algunas series. Por otro lado, recientemente se ha descrito la existencia de alteraciones genéticas específicas en los casos de LCM leucemizado, concretamente pérdidas de material a nivel de 8p21.3, que se asociarían a un peor pronóstico. El objetivo de este trabajo fue analizar la prevalencia y el significado biológico y clínico de la leucemización en los pacientes con LCM.

La existencia de expresión hemoperiférica se analizó mediante citología y citometría de flujo en 48 pacientes. En 27 de ellos se realizaron además estudios de CGH.

Al diagnóstico, 44 pacientes (92%) presentaban expresión hemoperiférica detectable mediante citometría de flujo, incluyendo 8 pacientes (12%) sin evidencia de leucemización morfológica, la cual fue definida como la presencia de > 5% de linfocitos atípicos circulantes. En 25 pacientes (52%), el recuento linfocitario era $\geq 5 \times 10^9/L$. Los desequilibrios cromosómicos que se detectaron con mayor frecuencia mediante CGH fueron ganancias de 3q, 7p, 8q, 9q, 12q, y 13q y pérdidas de 13q, 1p, 9p, 11q, 10p, 17p, 6q, 8p y 9q. Los pacientes con expresión hemoperiférica detectable morfológicamente presentaron con mayor frecuencia mal estado general (ECOG ≥ 2 , $P=0,04$), esplenomegalia palpable ($P=0,01$) y recuentos plaquetarios bajos ($< 120 \times 10^9/L$, $P=0,007$). No se observaron diferencias en el patrón de ganancias y pérdidas observadas mediante CGH entre los pacientes con expresión hemoperiférica detectable morfológicamente y los casos sin evidencia de leucemización. Por el contrario, los pacientes con $\geq 5 \times 10^9/L$ linfocitos presentaron con mayor frecuencia ganancias de 3q ($P=0,02$), pérdidas de 10p ($P=0,05$), peor respuesta al tratamiento ($P=0,04$) y una menor supervivencia ($P=0,05$).

Con los resultados obtenidos se puede concluir que la expresión hemoperiférica detectada mediante citometría de flujo se observa en la mayoría de los pacientes diagnosticados de LCM, incluso en aquellos con recuentos linfocitarios normales. Aunque la leucemización morfológica no se asoció en nuestro estudio con ninguna alteración citogenética específica

detectable mediante CGH, los casos con linfocitosis $\geq 5 \times 10^9/L$ presentaron anomalías citogenéticas diferenciales y un peor pronóstico.

Leukemic Involvement Is a Common Feature in Mantle Cell Lymphoma

Ana Ferrer, MD¹
 Itziar Salaverria, BS²
 Francesc Bosch, MD, PhD¹
 Neus Villamor, MD, PhD³
 María Rozman, MD, PhD³
 Silvia Beà, PhD²
 Eva Giné, MD¹
 Armando López-Guillermo, MD, PhD¹
 Elías Campo, MD, PhD^{2,3}
 Emili Montserrat, MD, PhD¹

¹ Department of Hematology, Hospital Clinic, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

² Department of Pathology, Hospital Clinic, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

³ Hematopathology Unit, Hospital Clinic, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

The first 2 authors contributed equally to this work.

Supported by a grant from Spanish Ministry of Health; Grant number: 05/0213; Grant sponsor: Marató de TV3; Grant number: TV051810; Grant sponsor: Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung; Grant number: D-1643; Grant sponsor: Spanish Ministry of Education and Science, European Union Contract LSHC-CT 2004-503351, and the Lymphoma Research Foundation; Grant number: SAF 05/5855

Dr. Ferrer's Current address: Laboratori de Citologia Hematològica, Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

Address for reprints: Francesc Bosch, MD, PhD, Department of Hematology, Hospital Clinic, University of Barcelona, Villarroel 170, 08036, Barcelona, Spain; Fax: (011) 34 93 2275484; E-mail: fbosch@clinic.ub.es

Received November 16, 2006; revision received February 7, 2007; accepted February 12, 2007.

BACKGROUND. The reported incidence of peripheral blood involvement in patients with mantle cell lymphoma (MCL) ranges from 13% to 77%. The aim of the study was to analyze the prevalence and the biologic and clinical significance of leukemic involvement in a series of patients with MCL.

METHODS. Leukemic expression was assessed by conventional morphology and flow cytometry (FC) in 48 patients. In addition, comparative genomic hybridization (CGH) was performed in 27 patients.

RESULTS. At diagnosis, 44 patients (92%) had evidence of leukemic expression by FC, including 8 patients (17%) without morphologically apparent leukemic involvement. Moreover, a lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/L$ was observed in 25 cases (52%). The most frequent imbalances detected by CGH were gains of 3q, 7p, 8q, 9q, 12q, and 13q, and losses of 13q, 1p, 9p, 11q, 10p, 17p, 6q, 8p, and 9q. Using a cutoff of $5 \times 10^9/L$ lymphocytes, cases with lymphocytosis more frequently presented with gains of 3q ($P = .02$), losses of 10p ($P = .05$), a low response rate ($P = .04$), and a short survival ($P = .05$).

CONCLUSIONS. Leukemic expression at diagnosis detected by FC was found to be highly frequent in this series of patients with MCL. Although morphologically apparent leukemic expression was not associated with specific chromosomal alterations detected by CGH, a lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/L$ was correlated with particular genetic abnormalities and a poor outcome. *Cancer* 2007;109:2473–80. © 2007 American Cancer Society.

KEYWORDS: mantle cell lymphoma, leukemic involvement, comparative genomic hybridization, flow cytometry.

Mantle cell lymphoma (MCL) is a lymphoid neoplasm derived from mature B-cells usually coexpressing CD5 and histologically characterized by a nodular or diffuse proliferation of atypical lymphocytes. Two cytologic variants of MCL have been identified, classical and blastoid, with the last including pleomorphic and blastic subtypes.¹ MCL is genetically characterized by the presence of t(11;14)(q13;q32), which juxtaposes the *Cyclin D1* gene (11q13) with the *IgH* gene (14q32).² This alteration leads to the overexpression of cyclin D1, which plays an important role in cell cycle control at G₁-S transition³ by overcoming the suppressor effect of the retinoblastoma protein (Rb)⁴ and *p27^{Kip1}*.⁵ *Cyclin D1* overexpression is a highly specific molecular marker of MCL because it is expressed in virtually all of these tumors but only in a few cases of aggressive chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma and multiple myeloma. In addition, Cyclin D1 is overexpressed at the mRNA and protein levels in a high number of hairy cell leukemias, although its expression is much lower than in MCLs and is not associated with *Cyclin D1* gene rearrangement or amplification.⁶

Different studies using conventional cytogenetics,^{7,8} comparative genomic hybridization (CGH),⁹⁻¹² and array-based CGH¹³⁻¹⁵ have shown that MCLs carry a high number of chromosomal and genetic alterations, some of which are associated with aggressive histologic variants and an adverse outcome.¹⁶⁻¹⁹

From the clinical standpoint, MCL is a relatively uncommon type of B-cell lymphoma that represents 5% to 10% of non-Hodgkin lymphomas. MCL is more frequent in elderly males, who are diagnosed in an advanced stage of the disease with frequent extranodal involvement (eg, bone marrow, gastrointestinal tract, or Waldeyer ring). MCL has an adverse clinical course characterized by poor response to conventional chemotherapy and a median overall survival (OS) of 3 to 5 years.²⁰⁻²²

To our knowledge, relatively few studies to date have focused on the bone marrow and peripheral blood involvement in MCL. It is interesting to note that the incidence of leukemic expression varies highly in different studies, ranging from 13% to 77%.²¹⁻²⁵ This discrepancy could be due to patient selection bias and different morphologic and immunophenotypic criteria to define leukemic expression. Moreover, in many of these series a central histologic review or extensive immunophenotypic characterization of the samples were not performed. In addition, studies comparing genetic abnormalities between patients with nodal and leukemic MCL have suggested that, although both display similar genomic patterns of losses and gains, specific alterations may be associated with leukemic dissemination and a poor prognosis. In particular, the analysis of genetic alterations in leukemic cases demonstrated that genomic loss of chromosome 8p21.3 at the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor gene cluster occurred more frequently in these patients than in those with lymph node disease.^{26,27}

In view of this background, we investigated the incidence of peripheral blood involvement in a large series of patients with MCL by both morphologic and immunophenotypic analysis. In addition, clinical features, genetic abnormalities detected by CGH, and patient outcome were determined.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

Forty-eight patients diagnosed with MCL from 1988 to 2002 in a single institution (Department of Hematology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain) were included in this study on the basis of sample avail-

ability for flow cytometry (FC) analysis. Diagnosis of MCL was established according to the World Health Organization (WHO) criteria and was confirmed by histologic, immunophenotypic, genetic, and molecular studies. Patients were selected only if a histologic specimen suitable for establishing the diagnosis of MCL was available. The following samples were collected and analyzed for this study: peripheral blood from all the patients, lymph node (38 patients), spleen (8 patients), tonsil (4 patients), gastrointestinal biopsy (2 patients), liver, and breast (1 patient each). In 7 patients different tissues were analyzed (lymph nodes and spleen in 5, liver and spleen in 1, lymph node and bowel in 1). Informed consent was required from all patients in accordance with the local ethics committee guidelines.

Staging maneuvers at diagnosis included thoracic, abdominal, and pelvic computed tomography and unilateral bone marrow biopsy (47 patients). Biopsies of other extranodal sites were performed whenever their involvement was suspected.

The following initial data were recorded and evaluated for analysis in each patient: 1) clinical data (age, gender, performance status according to the Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] scale, and the presence of B-symptoms [fever, night sweats, weight loss]); 2) histologic data (typical or blastoid, nodular, mantle-zone, or diffuse variants); 3) hematologic and biochemical parameters (leukocyte and lymphocyte counts, presence of atypical lymphocytes in peripheral blood, hemoglobin, platelet count, serum lactate dehydrogenase [LDH], and β_2 -microglobulin levels); 4) tumor extension data (lymph node and extranodal involvement, number of extranodal involved sites, splenomegaly, hepatomegaly, Ann Arbor stage, and bone marrow infiltration); and 5) the International Prognostic Index (IPI), defined by the International non-Hodgkin Lymphoma Prognostic Factors Project.

Complete response (CR) was defined as the total disappearance of tumor masses and disease-related symptoms as well as the normalization of the initial abnormal tests for at least 1 month. Partial response (PR) was considered when tumor masses or organ infiltration decreased by at least 50% along with the disappearance of disease-related symptoms. Patients not included in these categories and early deaths were considered nonresponders.

Morphologic, Histologic, and Immunophenotypic Analysis of MCL Cells

Tissue biopsies were classified according to the currently accepted histologic criteria. Immunophenotype of malignant cells was obtained by standard

immunohistochemical methods performed in frozen or formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. Cyclin D1 overexpression was demonstrated in all the cases by immunohistochemistry.

Slides of peripheral blood and bone marrow were stained with May-Grunwald-Giemsa, whereas bone marrow biopsy sections were stained with hematoxylin and eosin. Two independent observers (N.V. and M.R.) reviewed peripheral blood slides, counting a minimum of 500 cells per case, and bone marrow trephines to determine the number and morphologic characteristics of circulating atypical cells, as well as the pattern and extent of bone marrow infiltration. Overt leukemic expression was defined as the presence of >5% lymphocytes with atypical morphology in peripheral blood.

The presence of MCL cells in peripheral blood was also assessed using a direct immunofluorescence technique. Fifteen thousand cells were acquired in a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, Calif) and analyzed using Paint-a-gate software (Becton-Dickinson). The panel of monoclonal antibodies included at least CD10, CD19, CD20 or CD22, CD23, kappa and lambda light chains, a pan-T-cell marker (CD2 or CD3), and CD5. The presence of a distinct CD5-positive, CD23-negative B-cell population demonstrating strong CD20 or CD22, and the detection of light chain restriction in B cells were considered indicative of leukemic involvement.

Cytogenetic and Molecular Analysis

Cytogenetics and molecular genetics

Cytogenetic and molecular studies were performed to confirm the diagnosis of MCL. Conventional cytogenetic analysis was performed on tumor cells isolated from bone marrow or peripheral blood as described elsewhere.²⁸ In 14 patients, the classic t(11;14)(q13;q32) was demonstrated and in 2 additional cases the t(11;14) was detected by fluorescence in situ hybridization (FISH). Moreover, 11q13 rearrangement was demonstrated in 14 additional patients by polymerase chain reaction (PCR) analysis according to previously described techniques.²⁹

Comparative genomic hybridization

High molecular weight DNA was extracted from 17 lymph nodes and 10 involved peripheral blood using the standard Proteinase K/RNase treatment and phenol-chloroform extraction. Normal DNA was obtained from 2 healthy blood donors (1 man and 1 woman). DNA was diluted to a concentration of 40–60 ng/ μ L and 1 μ L of each sample was analyzed in a 0.8% agarose gel and stained with ethidium bromide to verify quality and concentration.

CGH was performed using a commercially available CGH kit provided by Vysis (Downers Grove, Ill). Hybridizations and digital image acquisition, processing, and evaluation were performed on a Cytovision Ultra workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK) as described previously.¹⁰

Signal ratios >1.25 or <0.75 were considered chromosomal gains or losses, respectively. Ratios exceeding 1.5 and/or strong focal signals with the ratio profile showing overrepresentation were considered high-level DNA amplifications. CGH alterations present in at least 5 cases (19%) were selected and tested for their correlation with clinical data.

Statistical Methods

Differences among patient subgroups were compared using the Fisher exact test (2-tailed) and the Student *t* test. OS was defined as the time from diagnosis to the time of death. Patients still alive at the time of last follow-up were censored at the last known date of contact. The actuarial survival analysis was performed according to the method of Kaplan and Meier³⁰ and differences in survival between patient groups were analyzed by the log-rank test. *P*-values $\leq .05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Patient Characteristics

The main initial characteristics of the 48 patients are detailed in Table 1. The median age was 64 years (range, 40–84 years) and 75% of patients were men. Thirty-six patients (75%) were diagnosed with typical morphologic variant and 12 were diagnosed with blastoid morphology (25%), including pleomorphic (2 cases) and blastic (10 cases) subtypes. MCL demonstrated a diffuse growth pattern in 41 cases, nodular in 6 cases, and mantle-zone in 1 case.

The median leukocyte count was $11.6 \times 10^9/L$ (range, 1.1 – $412 \times 10^9/L$). A lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/L$ was observed in 25 cases (52%), whereas 17 patients (35%) presented with $\geq 10 \times 10^9/L$ lymphocytes. Sixteen patients (33%) presented with Hb <100 g/L and the platelet count was $<120 \times 10^9/L$ in 42%. As per the IPI, 3 patients (6%) were of low risk, 29% were of low-intermediate risk, 40% of high-intermediate risk, and 25% of high risk. Bone marrow was infiltrated in 40 of 47 patients, although only 27 bone marrow biopsy sections were available for review. The pattern of bone marrow involvement was nodular in 3 patients (10%), interstitial in 8 patients (30%), both nodular and interstitial in 8 patients (30%), and diffuse in another 8 patients (30%).

TABLE 1
Main Initial Characteristics of 48 Patients With Mantle Cell Lymphoma

Variable	Percent
Age ≥ 60 y	51
Sex (men)	75
Morphologic variant	
Typical	75
Blastoid	25
Performance status (ECOG ≥ 2)	33
B-symptoms	46
Bulky disease	17
Hepatomegaly	35
Splenomegaly	65
Increased serum LDH levels*	53
Increased serum β_2 -microglobulin levels [†]	61
Advanced stage (Ann Arbor III-IV)	98
Extranodal involvement	96
Bone marrow infiltration	85
≥ 2 extranodal involved sites	35
High/intermediate-risk and high-risk IPI	65

ECOG indicates Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; IPI, International Prognostic Index.

* Data were available for 47 patients.

[†] Data were available for 36 patients.

Treatment varied over time and included chemotherapeutic regimens without anthracyclines in 15 patients (31%) and combination therapy including anthracyclines in 33 patients (69%). All patients were assessable for response. CR, PR, and failure rates were 13%, 46%, and 41%, respectively. After a median follow-up of 29 months (range, 1–138 months), 40 patients (83%) had died. The median OS of the series was 30 months.

Peripheral Blood Morphology and Immunophenotype

The morphologic review of May-Grunwald-Giemsa-stained peripheral blood smears disclosed that 36 of 48 patients (75%) had overt, morphologically apparent, leukemic expression at the time of diagnosis. The median leukocyte count in patients with overt leukemia was $14.8 \times 10^9/L$ (range, 2.4 – $412 \times 10^9/L$) and the median lymphocyte count was $8.5 \times 10^9/L$ (range, 0.7 – $400 \times 10^9/L$), with 11 patients having less than $5 \times 10^9/L$ lymphocytes. The median percentage of atypical lymphocytes was 43% (range, 13%–91%). In the majority of the cases, morphologic analysis demonstrated a mixture of typical MCL cells and small lymphocytes. Occasional blastoid cells were observed in peripheral blood but the proportion of these cells was always inferior to 5% of lymphocytes. Among patients with morphologically apparent leukemic expression, 39% had a hemoglobin level <100 g/L and 53% a platelet count $<120 \times 10^9/L$. The his-

tologic analyses of such patients showed that 28 patients (78%) had typical MCL histology (including 3 with nodular and 1 with mantle-zone pattern), whereas 8 presented with blastoid variants (7 blastic cases and 1 pleomorphic case).

Eight of 12 patients (67%) with no morphologically apparent leukemic expression disclosed a characteristic MCL lymphocyte population in peripheral blood by FC. As expected, FC was also positive for MCL in all patients with overt leukemic expression. A total of 44 patients (92%) had evidence of leukemic involvement by FC. The remaining 4 cases from this series presented normal peripheral blood morphology, immunophenotypic analysis of lymphocytes, and bone marrow biopsy. The median percentage of the monoclonal B-cell population was 79% for the 36 patients presenting with morphologically apparent leukemic expression (range, 28–97%) and 32% (14–74%) for the 8 patients with peripheral blood involvement only detectable by FC. Among the patients with positive FC, the phenotype was considered typical (CD5+, CD23–) in 40 patients. In 3 cases MCL cells expressed CD23 (41%, 61%, and 73%, respectively), whereas the remaining case presented with weak expression of CD5 (25% of B lymphocytes being positive) confirmed by immunohistochemistry.

Chromosomal Alterations of Leukemic MCL

Twenty-seven MCL samples were analyzed by CGH, with 23 corresponding to patients with overt leukemic expression, 3 from patients with peripheral blood involvement only detected by FC, and 1 with normal peripheral blood morphology and FC. Twenty-five patients (93%) demonstrated chromosome alterations with a mean number of 5.7 ± 4.4 per sample, displaying an elevated total number of gains ($n = 86$) and losses ($n = 69$). Only 1 patient had a single alteration that was a loss of 1p22-p32. The most frequent gains were on chromosomes 3q (55%), 7p (26%), 8q (22%), 9q (22%), 12q (22%), and 13q (19%) (Fig. 1) (Table 2). High-level DNA amplifications were identified in 11 different regions of the genome, with 18q22-qter being the most recurrent amplified region (15%). Minimal common gained regions were limited to 3q23-qter, 7p15-pter, 8q23-qter, 9q34-qter, 12q12-q13, and 13q22-q31.

The most frequent losses were found on chromosomes 13q (37%), 1p (26%), 11q (26%), 9p (26%), 10p (22%), 17p (22%), 6q (19%), 8p (19%), and 9q (19%). The regions frequently involved by loss of genetic material were delineated to 1p22-p31, 11q22-q23, 9p21-pter, 10p14-pter, 17p12-pter, 6q24-qter, 8p21-pter, and 9q21-q22. On chromosome 13q, 2 different areas of loss were identified (13q11-q21 and

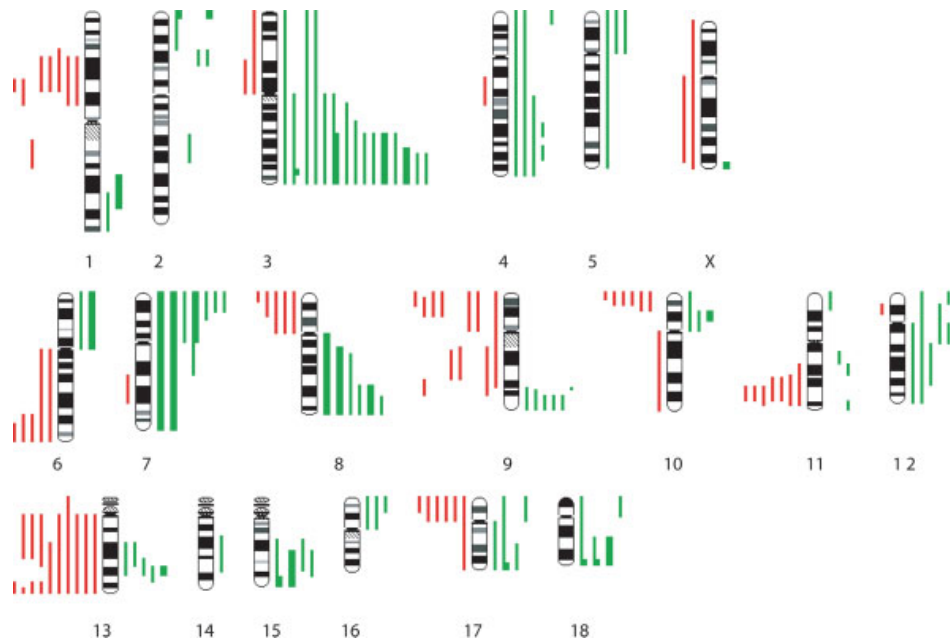


FIGURE 1. Ideogram of the distribution of gains and losses of genetic material detected by comparative genomic hybridization in 27 cases of mantle cell lymphoma. Red bars on the left correspond with genetic losses, whereas the green bars on the right indicate genetic gains. Bold bars indicate amplifications. Each line represents a gained or lost region in a single tumor.

TABLE 2
CGH Alterations in MCL According to Lymphocyte Count

	Lymphocyte count		
	$\geq 5 \times 10^9$ N = 16	$< 5 \times 10^9$ N = 11	Total N = 27
Gains			
3q ⁺	12 (75%)	3 (27%)	15 (55%)
7p	4 (25%)	3 (27%)	7 (26%)
9q	4 (25%)	2 (18%)	6 (22%)
8q	4 (25%)	2 (18%)	6 (22%)
12q	3 (19%)	3 (27%)	6 (22%)
13q	4 (17%)	1 (9%)	5 (19%)
Losses			
13q	5 (31%)	5 (45%)	10 (37%)
1p	3 (19%)	4 (36%)	7 (26%)
9p	4 (25%)	3 (27%)	7 (26%)
11q	5 (31%)	2 (18%)	7 (26%)
10p*	6 (37%)	0 (0%)	6 (22%)
17p	5 (31%)	1 (9%)	6 (22%)
6q	3 (19%)	2 (18%)	5 (19%)
8p	3 (19%)	2 (18%)	5 (19%)
9q	1 (6%)	4 (36%)	5 (19%)

CGH indicates comparative genomic hybridization; MCL, mantle cell lymphoma.

* $P < .05$.

13q32-qter). Tumors with 17p loss had more chromosomal imbalances than patients with a normal chromosome 17 profile (9.3 ± 6.15 vs 4.7 ± 3.3 , respectively; $P = .05$). However, cases with a lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/L$ (16 of 27 patients; 59%) more

frequently had gains of 3q and losses of 10p than patients with less than $5 \times 10^9/L$ lymphocytes (75% vs 27% [$P = .02$] and 37% vs 0% [$P = .05$], respectively) (Table 2).

Correlation Between Leukemic Expression, Initial Features, and Outcome

We compared the clinical and biological characteristics of patients with apparent morphologic leukemic expression and those with normal morphology. Patients with overt leukemic expression more frequently had a poor performance status (ECOG ≥ 2 ; $P = .04$), palpable splenomegaly ($P = .01$), and lower platelet counts ($< 120 \times 10^9/L$; $P = .007$) than patients with normal peripheral blood smears. No differences in terms of other clinical and biological variables were found. In addition, patients with lymphocyte counts $\geq 5 \times 10^9/L$ had different initial variables (Table 3), and also a lower response rate (44% vs 74%; $P = .04$) and a shorter survival than those with less than $5 \times 10^9/L$ lymphocytes (median OS of 23 vs 35 months, respectively; $P = .05$) (Fig. 2).

DISCUSSION

In this study we analyzed the initial characteristics; the morphologic, immunophenotypic, and genomic profiles; and the outcome of 48 patients with newly diagnosed MCL according to whether there was

TABLE 3
Prognosis According to Lymphocyte Count

	Lymphocyte count		P
	$< 5 \times 10^9/L$ N = 23	$\geq 5 \times 10^9/L$ N = 25	
ECOG ≥ 2	5 (22%)	11 (44%)	.03
Platelet count $< 120 \times 10^9/L$	6 (26%)	14 (56%)	.04
Hemoglobin level < 100 g/L	4 (17%)	12 (48%)	.03
Lymphadenopathy	18 (78%)	20 (80%)	NS
Splenomegaly	11 (48%)	20 (80%)	.03
Response rate (CR + PR)	17 (74%)	11 (44%)	.04
Median OS	35 mo	23 mo	.05

ECOG indicates Eastern Cooperative Oncology Group; NS, not significant; CR, complete response; PR, partial response; OS, overall survival.

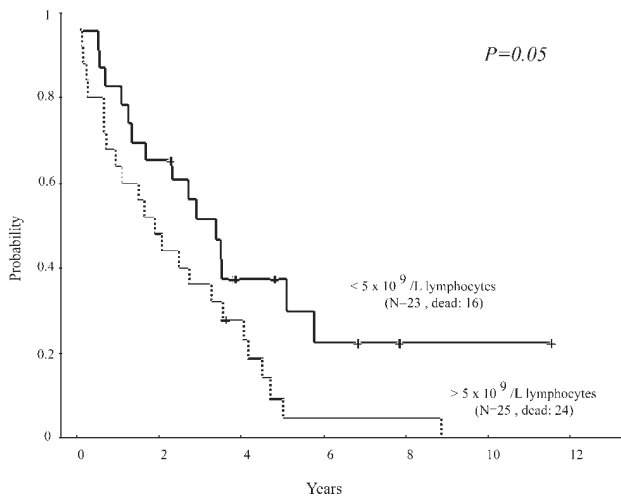


FIGURE 2. Overall survival curve of 48 patients with mantle cell lymphoma according to the lymphocyte count in the peripheral blood. The median survival for patients with a lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/L$ was 23 months versus 35 months for patients without lymphocytosis.

involvement of peripheral blood detected on morphologic grounds or by FC.

Although peripheral blood and bone marrow involvement in MCL is a well-known feature, to our knowledge its incidence and clinical significance have not been fully analyzed. Thus, peripheral blood involvement has been reported in 13% to 77% of the patients, depending on the series. However, many of these studies include a small number of patients with primarily lymph disease and lack well-defined morphologic and immunophenotypic criteria to define leukemic expression.²¹⁻²³ Recently, some studies have focused on patients with MCL presenting with marked lymphocytosis and overt leukemia, mainly describing the morphologic spectrum of circulating lymphoma cells and the histologic pattern of bone

marrow biopsy.^{24,31-36} In contrast, peripheral blood immunophenotyping by FC has not been thoroughly analyzed in MCL patients, and just a small number of cases showing peripheral blood involvement only detectable by FC have been reported.²⁴ In a recent study published by Gu et al,³⁷ FC on peripheral blood and bone marrow samples was performed to determine the value of *Cyclin D1/IgH* rearrangement detected by FISH in leukemic MCL. FC was positive for MCL in only 26% of the peripheral blood or bone marrow samples. In our study, after an extensive FC analysis, leukemic involvement was detected in almost all patients (92%), including cases without morphologically apparent leukemia. The differences found in peripheral blood involvement between our study and that published by Gu et al. could be explained by the unexpected low percentage of bone marrow involvement detected by those authors.

The neoplastic MCL cells are monoclonal B-cells with relatively intense surface immunoglobulins, coexpressing CD5 and negative for CD23 and CD10. In the current series, 8% of the cases presented with an atypical immunophenotype (weak expression of CD5 or positivity for CD23), a similar proportion to that previously reported.^{21,31,33,36} It is interesting to note that these cases had an unequivocal diagnosis of MCL supported by tissue histology, Cyclin D1 expression, and the presence of t(11;14)(q13;q32).

In addition to the t(11;14)(q13;q32), many genetic aberrations have been described in MCL. It has recently been proposed that genomic loss of chromosome 8p occurs more frequently in patients with leukemic disease, defined as $>10\%$ CD5+/CD19+ cells in the peripheral blood, than in lymph node MCL with no blood involvement.²⁶ Moreover, in a small series of cases of leukemia with t(11;14), the most frequent additional genetic abnormality was the loss of 8p.²⁷ Of note, these patients presented with lymphocytosis without nodal involvement at diagnosis. The genomic alterations found in our series were concordant with those generally observed in MCL.^{7-11,13} In contrast to the findings described in leukemic variants,^{15,26,27} we did not find a deletion of 8p as a specific marker for leukemic involvement. In total, we found a genomic loss of 8p in 5 patients, 4 of whom presented with morphologically apparent leukemic involvement and the remaining case with MCL cells detected only by FC. This discrepancy in the prevalence of 8p losses could be explained by different criteria for selection of patients as well as by the different definition of leukemic involvement. In this sense, in the present series the diagnosis of MCL was based on histologic and molecular criteria, in opposition to other studies

that selected cases among different chronic B-cell lymphoproliferative disorders on the basis of the presence of t(11;14). It is interesting to note that t(11;14) has been described in a variety of hematologic neoplasms, including B-prolymphocytic leukemia. Furthermore, some of these studies lacked strict immunophenotyping criteria to define peripheral blood involvement. In this regard, selection criteria based on the presence of CD5+/CD19+ cells without clonal light chain analysis could not ensure the presence of MCL cells in peripheral blood.

No differences concerning the genomic pattern of losses and gains were observed between patients with and without morphologically apparent leukemic involvement, which is not surprising when considering that most patients had leukemic expression detected by FC. However, MCL cases with $\geq 5 \times 10^9$ /L lymphocytes more frequently presented gains of 3q and losses of 10p. The gain of 3q, with a minimal common region at 3q26.1–27 was first detected by CGH in 1998 in 52% of MCLs.⁹ Thereafter, cytogenetic studies identified different secondary alterations in MCLs, including gains and trisomies of chromosome 3, which was confirmed by CGH by our group¹⁰ and others.^{8,15,26,27} With regard to losses of 10p, this alteration has been previously reported in MCL^{8,10} but, to the best of our knowledge, no related genetic targets have been described.

Several clinical and biological factors have been shown to have a prognostic impact in MCL. Thus, patients aged >60 years at diagnosis, with poor performance status, splenomegaly, advanced disease stage, and extranodal involvement are expected to have a short survival. In addition, and from the biologic standpoint, blastoid morphology, diffuse pattern, high Ki-67 index, increased mitotic activity, and TP53 gene abnormalities have been associated with an unfavorable outcome.^{21,22,38,39} The prognostic impact of peripheral blood involvement in MCL is controversial.^{21,22,31} Some studies have shown that the presence of absolute lymphocytosis at diagnosis is associated with a shorter survival,^{23,25} particularly when lymphocyte counts are greater than 10×10^9 /L.^{33,40} In contrast, other studies have shown that the survival of patients with leukemic MCL does not differ from that of patients with lymph node disease.^{24,36} In the current study, the overall median survival for the entire series was 30 months and no differences were observed between patients with overt leukemic MCL and the group without morphologic evidence of leukemic involvement. Circulating lymphoma cells detected either by morphology or by FC may be a manifestation of the biology of this disease rather than a poor prognostic indicator. How-

ever, it is important to note that patients with $\geq 5 \times 10^9$ /L lymphocytes had different genetic abnormalities and clinical outcome.

In conclusion, in the current series of patients with MCL, leukemic expression at the time of diagnosis detected by FC was a highly common feature even in patients with a normal lymphocyte count. It is important to note that a lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9$ /L was associated with specific genetic abnormalities and a poor outcome. New studies are warranted to define biologic factors that determine leukemic involvement.

REFERENCES

1. Swerdlow SH, Berger F, Isaacson PI, et al. Mantle cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001:168–170.
2. Motokura T, Bloom T, Kim HG, et al. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature*. 1991;350:512–515.
3. Jiang W, Kahn SM, Zhou P, et al. Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene*. 1993;8:3447–3457.
4. Dowdy SE, Hinds PW, Louie K, et al. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*. 1993;73:499–511.
5. Tong W, Pollard JW. Genetic evidence for the interactions of cyclin D1 and p27(Kip1) in mice. *Mol Cell Biol*. 2001; 21:1319–1328.
6. Bosch F, Jares P, Campo E, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood*. 1994;84:2726–2732.
7. Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al. 13q14 deletion in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinicopathologic features. *Haematologica*. 1999;84:589–593.
8. Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeyer A, Wolf-Peeters C, Van Den BH. Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 1999;84:594–599.
9. Monni O, Oinonen R, Elonen E, et al. Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998;21:298–307.
10. Bea S, Ribas M, Hernandez JM, et al. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood*. 1999;93:4365–4374.
11. Bentz M, Plesch A, Bullinger L, et al. t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;27:285–294.
12. Allen JE, Hough RE, Goepel JR, et al. Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br J Haematol*. 2002;116:291–298.
13. Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, et al. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood*. 2004;104:795–801.

14. Schraders M, Pfundt R, Straatman HM, et al. Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood*. 2005;105:1686–1693.
15. Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, et al. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood*. 2005;105:4445–4454.
16. Hernandez L, Hernandez S, Bea S, et al. c-myc mRNA expression and genomic alterations in mantle cell lymphomas and other nodal non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia*. 1999;13:2087–2093.
17. Fernandez V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol*. 2005;23:6364–6369.
18. Hernandez L, Bea S, Pinyol M, et al. CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res*. 2005;65:2199–2206.
19. Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D, Campo E. Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica*. 2006;91:11–16.
20. Weisenburger DD, Armitage JO. Mantle cell lymphoma—an entity comes of age. *Blood*. 1996;87:4483–4494.
21. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*. 1997;89:2067–2078.
22. Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, et al. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer*. 1998;82:567–575.
23. Duggan MJ, Weisenburger DD, Ye YL, et al. Mantle zone lymphoma. A clinicopathologic study of 22 cases. *Cancer*. 1990;66:522–529.
24. Cohen PL, Kurtin PJ, Donovan KA, Hanson CA. Bone marrow and peripheral blood involvement in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 1998;101:302–310.
25. Samaha H, Dumontet C, Ketterer N, et al. Mantle cell lymphoma: a retrospective study of 121 cases. *Leukemia*. 1998;12:1281–1287.
26. Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, et al. Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood*. 2001;98:3479–3482.
27. Vizcarra E, Martinez-Climent JA, Benet I, et al. Identification of two subgroups of mantle cell leukemia with distinct clinical and biological features. *Hematol J*. 2001;2:234–241.
28. Espinet B, Sole F, Woessner S, et al. Translocation (11;14)(q13;q32) and preferential involvement of chromosomes 1, 2, 9, 13, and 17 in mantle cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999;111:92–98.
29. Pinyol M, Campo E, Nadal A, et al. Detection of the bcl-1 rearrangement at the major translocation cluster in frozen and paraffin-embedded tissues of mantle cell lymphomas by polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol*. 1996;105:532–537.
30. Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation for incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457–481.
31. Wong KF, Chan JK, So JC, Yu PH. Mantle cell lymphoma in leukemic phase: characterization of its broad cytologic spectrum with emphasis on the importance of distinction from other chronic lymphoproliferative disorders. *Cancer*. 1999;86:850–857.
32. Viswanatha DS, Foucar K, Berry BR, et al. Blastic mantle cell leukemia: an unusual presentation of blastic mantle cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2000;13:825–833.
33. Schlette E, Lai R, Onciu M, et al. Leukemic mantle cell lymphoma: clinical and pathologic spectrum of twenty-three cases. *Mod Pathol*. 2001;14:1133–1140.
34. Onciu M, Schlette E, Bueso-Ramos C, Medeiros LJ. Leukemic mantle cell lymphoma with cells resembling prolymphocytes. *Am J Clin Pathol*. 2002;118:305–306.
35. Wong KF, So CC, Chan JK. Nucleolated variant of mantle cell lymphoma with leukemic manifestations mimicking prolymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2002;117:246–251.
36. Matutes E, Parry-Jones N, Brito-Babapulle V, et al. The leukemic presentation of mantle-cell lymphoma: disease features and prognostic factors in 58 patients. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:2007–2015.
37. Gu J, Huh YO, Jiang F, et al. Evaluation of peripheral blood involvement of mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization in comparison with immunophenotypic and morphologic findings. *Mod Pathol*. 2004;17:553–560.
38. Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol*. 1999;36:115–127.
39. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol*. 2005;131:29–38.
40. Pittaluga S, Verhoef G, Criel A, et al. Prognostic significance of bone marrow trephine and peripheral blood smears in 55 patients with mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 1996;21:115–125.

3. TERCER TRABAJO

3.1. RESUMEN

Infiltración del sistema nervioso central en el linfoma de células del manto.

La infiltración de territorios extraganglionares es un hecho frecuente en los pacientes diagnosticados de LCM. El riesgo de infiltración del SNC en estos pacientes es un hecho bien conocido, cuya incidencia oscila entre el 4% y el 22%, según distintos estudios. El objetivo de este trabajo fue analizar la incidencia y los factores de riesgo para el desarrollo de infiltración del SNC en una serie de 82 enfermos diagnosticados y tratados en un único centro, así como la evolución posterior de los pacientes que presentaron esta complicación.

La edad mediana de los pacientes incluidos en el estudio fue de 61 años, con un predominio del sexo masculino (73%). Cincuenta y nueve pacientes fueron diagnosticados de LCM típico y 21 (26%) de LCM blastoide. La mayoría de los pacientes se diagnosticaron en estadio clínico avanzado (92% en estadios III-IV), con infiltración de territorios extraganglionares (90%) y con un índice pronóstico internacional (IPI) de riesgo intermedio/alto o alto (84%). Once pacientes desarrollaron infiltración del SNC, con un riesgo actuarial a los 5 años del 26% (IC 95%: 10-42%). En un paciente asintomático la infiltración

del líquido cefalorraquídeo (LCR) se detectó en la punción lumbar realizada durante el estadiaje inicial. Los 10 pacientes restantes presentaron síntomas neurológicos durante la evolución de la enfermedad (mediana desde el diagnóstico: 25 meses), 5 pacientes durante el tratamiento y los otros 5 coincidiendo con la progresión sistémica de la enfermedad. La infiltración del SNC se observó con mayor frecuencia en pacientes con histología blastoide ($P=0,005$), índice proliferativo elevado (expresión de Ki-67 $\geq 50\%$) ($P=0,017$), cifra de LDH sérica ≥ 450 UI/L ($P=0,006$) e IPI de riesgo intermedio/alto o alto ($P=0,05$). Asimismo, los pacientes con afección de ≥ 2 territorios extraganglionares presentaron una mayor tendencia a desarrollar infiltración del SNC ($P=0,06$). En el estudio multivariante, el subtipo histológico ($P=0,03$, RR: 4,8) y la cifra de LDH sérica ($P=0,02$, RR: 4,8) fueron las variables que se asociaron a un mayor riesgo de infiltración del SNC en el LCM.

El tratamiento de la infiltración del SNC consistió en quimioterapia intratecal en dos pacientes y quimioterapia intratecal asociada a quimioterapia sistémica en siete casos. La mediana de supervivencia tras el desarrollo de enfermedad en el SNC fue de 4,8 meses (5 días-19 meses). La supervivencia global del grupo de pacientes que desarrolló esta complicación fue inferior a la del grupo que no la presentó ($P<0,001$, RR: 4,7). La causa de la muerte fue la progresión de la enfermedad sistémica en todos los pacientes excepto en uno que falleció tras desarrollar una sepsis en el periodo de aplasia postquimioterapia.

Con los resultados obtenidos de este trabajo, que analiza la serie más amplia de pacientes diagnosticados de LCM desde el punto de vista de la infiltración del SNC, se pudo concluir que esta complicación se presenta fundamentalmente en pacientes con LCM blastoide, índice proliferativo elevado, niveles de LDH sérica elevados e IPI de riesgo intermedio/alto o alto. El hecho de que, en la mayoría de pacientes, la infiltración del SNC aparezca en el contexto de recidivas o progresiones sistémicas hace imprescindible el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. El papel de la profilaxis de la infiltración del SNC debe ser investigado en el contexto de tratamientos más efectivos para el LCM que los existentes en la actualidad.

Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma

A. Ferrer^{1†}, F. Bosch¹, N. Villamor³, M. Rozman³, F. Graus², G. Gutiérrez¹, S. Mercadal¹, E. Campo³, C. Rozman¹, A. López-Guillermo^{1*} & E. Montserrat¹

¹Department of Hematology; ²Department of Neurology and; ³Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Postgraduate School of Hematology 'Farreras Valentí', Institut d'Investigació Biomedica 'August Pi i Sunyer', Barcelona, Spain

Received 17 May 2007; revised 9 August 2007; accepted 13 August 2007

Background: Extranodal involvement, including central nervous system (CNS), is a frequent event in patients with mantle cell lymphoma (MCL). However, the incidence, risk factors, and impact on outcome remain controversial.

Patients and methods: Main clinical, biological, and evolutive features of 82 patients (60 males/22 females; median age: 61 years) diagnosed with MCL (blastoid, 26%) in a single institution were analyzed for risk of CNS involvement and prognosis.

Results: Most patients had advanced stage and intermediate or high-risk International Prognostic Index (IPI). Eleven patients eventually developed CNS involvement with an actuarial 5-year risk of 26% (95% confidence interval 10% to 42%). In one asymptomatic patient, cerebrospinal fluid infiltration was detected at staging maneuvers (1/62; 1.6%). The remaining 10 patients developed neurological symptoms during the course of the disease (median time from diagnosis, 25 months). Initial variables predicting CNS involvement were blastoid histology, high proliferative index measured by Ki-67 staining, high lactate dehydrogenase (LDH) and intermediate- or high-risk IPI. Histological subtype and serum LDH maintained significance in multivariate analysis. Treatment of CNS infiltration consisted of intrathecal chemotherapy (two cases), and intrathecal chemotherapy plus systemic treatment (seven cases). Median survival after CNS involvement was 4.8 months, patients with this complication having shorter survival than those with no CNS disease.

Conclusion: This study confirms the high incidence of CNS involvement in MCL patients. Treatments aimed at preventing this complication are warranted.

Key words: central nervous system involvement, mantle cell lymphoma, prognosis, risk factors

introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a distinct subtype of non-Hodgkin's lymphoma derived from mature B cells usually coexpressing CD5 and histologically characterized by a nodular or diffuse proliferation of atypical lymphocytes. Two cytological variants of MCL have been identified, classical and blastoid, the latter including pleomorphic and blastic subtypes [1]. MCL is genetically characterized by 11q13 translocations and *Bcl-1* rearrangement. This alteration leads to the overexpression of cyclin D1, which plays an important role in the cell cycle control at the G₁-S transition by overcoming the suppressor effect of retinoblastoma protein and *p27^{Kip}*.

MCL accounts for 5%–10% of lymphomas and particularly occurs in elderly males who, at diagnosis, frequently show

advanced disease, generalized lymphadenopathy, and splenomegaly. The disease has an adverse clinical course characterized by a poor response to chemotherapy and a median overall survival (OS) of 3–5 years [2–6].

Extranodal involvement, including bone marrow, gastrointestinal tract, and Waldeyer's ring, is a well-known feature in patients with MCL. The risk for central nervous system (CNS) infiltration was first reported by Bedotto et al. [7] in 1986 and Ellison et al. [8], and subsequently confirmed by our own group [9] in a series of 22 patients of whom five (22%) eventually had CNS involvement, and by others [10, 11], who reported an overall incidence of 4% and 9%, respectively. However, the incidence, predicting factors, and outcome of CNS involvement in patients with MCL have not been thoroughly investigated in large series of patients from single institutions.

The aim of the present study was to assess the incidence and factors for CNS involvement in patients with MCL diagnosed and followed up at a single institution. In addition, we analyzed the clinical features, therapy, and outcome of patients with MCL once CNS infiltration was detected.

*Correspondence to: Dr A. López-Guillermo, Department of Hematology, Hospital Clínic, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel: +34-932275575; Fax: +34-932275484; E-mail: alopezg@clinic.ub.es

†Present address: Laboratori de Citologia Hematològica, Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

patients and methods

patients

Eighty-two patients diagnosed with MCL from 1988 to 2003 in a single institution were included in this study. Diagnosis of MCL was established according to the World Health Organization criteria [1] and confirmed by histological, immunophenotypic, genetic, and molecular studies. Blastoid variants were recognized based on morphological characteristics.

Initial staging included thoracic, abdominal, pelvic computed tomography (CT), and unilateral bone marrow biopsy (79 patients). Biopsies of other extranodal sites were carried out whenever its involvement was suspected. A comprehensive immunophenotypic analysis of peripheral blood was carried out in 46 patients.

In each patient the following initial data were recorded and evaluated—(i) clinical data: age, gender, performance status according to the Eastern Cooperative Oncology Group scale, and presence of B symptoms (fever, night sweats, weight loss); (ii) histologic data: typical or blastoid, nodular, mantle zone or diffuse variants, and immunohistochemical staining for Ki-67; (iii) hematologic and biochemical parameters: leukocyte and lymphocyte counts, presence of atypical lymphoid cells in peripheral blood, hemoglobin, platelet count and serum lactate dehydrogenase (LDH), and β_2 -microglobulin levels; (iv) tumor extension data: nodal and extranodal involvement, number of extranodal involved sites, palpable splenomegaly, hepatomegaly, bone marrow infiltration, and Ann Arbor stage; (v) the International Prognostic Index (IPI), as defined by the International non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project.

Complete response (CR) was defined as the total disappearance of tumor masses and disease-related symptoms as well as the normalization of the initial abnormal tests for at least 1 month. Partial response (PR) was considered when tumor masses or organ infiltration decreased by at least 50% along with the disappearance of disease-related symptoms. Patients not included in these categories and early deaths were considered as nonresponders. Informed consent to use the clinical data was required from all the patients in accordance with the local Ethic Committee guidelines.

assessment of CNS involvement

The diagnosis of CNS infiltration was based on clinical findings and on the presence of malignant cells in cerebrospinal fluid (CSF), consistent with the diagnosis of MCL. In the first 20 patients of the present series, who have been previously reported [9], a lumbar puncture was not carried out at diagnosis unless CNS involvement was suspected on clinical grounds. In the subsequent 62 cases, CSF assessment by a lumbar puncture was included as one of the staging maneuvers at diagnosis. Cells from CNS fluid were cytopinned and stained with May-Grünwald-Giemsa for morphology assessment. In some cases, cells from CNS were stained with a panel of monoclonal antibodies that included CD19, CD20, CD23, kappa and lambda light chains, CD3, and CD5. CT or magnetic resonance imaging (MRI) scans of the brain were done to detect parenchymal or meningeal infiltrations when such involvement was suspected.

Data collected at the time of diagnosis of CNS infiltration included neurological symptoms, physical examination findings, diagnostic procedures, stage of the disease, treatment, and response.

statistical methods

Differences among the subgroups of patients were compared with the Fisher's exact test (two-tailed) or the Student's *t*-test. OS was defined as the time from diagnosis to the time of death or last follow-up. Patients still alive were censored at the last known date of contact. The actuarial survival analysis was carried out according to the method described by Kaplan and Meier [12] and differences in survival analyzed by the log-rank test.

Prognostic factors found to be significant in the univariate analysis were included in a multivariate analysis carried out by the stepwise proportional hazard regression method of Cox. The influence of CNS infiltration on survival was assessed in a time-dependent manner by means of the method described by Mantel and Byar [13]. *P* values <0.05 were considered statistically significant.

results

patient characteristics

The main initial characteristics of the 82 patients are detailed in Table 1. Median age was 61 years (range, 40–84 years) and 73% of patients were males. Fifty-nine of 80 patients (74%) were diagnosed with typical morphologic variant and 21 with blastoid morphology (26%), including pleomorphic (five cases) and blastic (16 cases) subtypes. MCL showed a diffuse growth pattern in 71 cases, nodular in eight, and mantle zone in one case. In two patients with lymph node biopsy-based diagnosis of MCL, the histologic subtype could not be established. Immunohistochemical staining for Ki-67 was available in 46 patients, in 18 of them (39%) being $\geq 50\%$. The vast majority of patients presented with advanced disease (92% in stage III–IV). Extranodal involvement was found in 74 patients (90%), including bone marrow infiltration in 64 of 79 patients (81%). The median leukocyte and lymphocyte counts were $8.8 \times 10^9/l$ (1.1 – $322 \times 10^9/l$) and $2.75 \times 10^9/l$ (0.50 – $99 \times 10^9/l$), respectively. A lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/l$ was observed in 29 cases. Fourteen patients presented with hemoglobin <100 g/l and the platelet count was <100 $\times 10^9/l$ in 18 patients. As per the IPI, 16% patients were of low risk,

Table 1. Main initial characteristics of 82 patients with mantle cell lymphoma

Variable	Percent
Age ≥ 60 years	52
Gender (male/female)	73/27
Morphological variant	
Typical	74
Blastoid	26
Ki-67 expression $\geq 50\%$ (available in 46 patients)	39
Poor performance status (ECOG ≥ 2)	28
B symptoms	35
Bulky disease	15
Hepatomegaly	34
Splenomegaly	49
Extranodal involvement	90
Bone marrow infiltration	81
≥ 2 extranodal involved sites	40
Advanced stage (Ann Arbor III–IV)	92
Increased serum LDH levels (available in 79 patients)	38
Increased serum β_2 -microglobulin levels (available in 56 patients)	41
High/intermediate and high-risk IPI	84

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; IPI, International Prognostic Index.

28% of low-intermediate risk, 34% of high-intermediate risk, and 22% of high risk.

Treatment varied over the time and included chemotherapeutic regimens without anthracyclines in 20 patients (25%) and combination therapy with anthracyclines in 61 (75%). In 16 patients (20%) first-line treatment included high-dose methotrexate (MTX) (Hyper cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone, high-dose methotrexate, cytarabine regimen) [14], whereas 11 additional patients were treated with this regimen in subsequent recurrences. One patient was not treated because she died before starting therapy. Seventy-nine patients were assessable for response. CR, PR, and failure rates were 17%, 49%, and 34%, respectively. At the time of the last follow-up, 63 patients (77%) had died, with a median OS of 28 months (range, 1–136).

CNS involvement

Eleven of 84 patients (13%) developed CNS involvement. In one asymptomatic patient, CSF infiltration was detected in the lumbar puncture carried out during staging maneuvers. This patient was diagnosed with typical diffuse MCL in a lymph node biopsy. She presented with advanced disease (stage IV), increased serum LDH and β_2 -microglobulin levels, and a high-risk IPI. The risk of CNS involvement at diagnosis as assessed by systematic lumbar puncture was of 1/62 [1.6%; 95% confidence interval (CI) 0% to 9%].

The remaining 10 patients eventually developed CNS involvement during the course of the disease. Main characteristics of these patients are listed in Table 2. Histology of lymph node biopsies disclosed a typical subtype in six cases (one nodular, five diffuse) and blastoid morphology in five (four blastic, one pleomorphic). All patients had advanced-stage disease, nine patients (82%) presented with bone marrow infiltration, and eight cases (73%) presented with ≥ 2 extranodal sites involved. Four patients (36%) had B symptoms and a poor performance status. As per the IPI, four patients (36%)

were of low-intermediate risk, three (28%) of high-intermediate risk, and four (36%) of high risk. Two of eleven patients (18%) had achieved a CR with first-line combination chemotherapy and a PR was observed in four cases (36%).

Development of CNS infiltration was seen at a median time of 25 months from diagnosis (range, 5–130). All 10 patients who developed CNS infiltration during follow-up presented with neurological symptoms: facial palsy in four cases, sciatalgia in four, diplopia in two, paraparesis in two, and confusional syndrome, trigeminal sensitive symptoms, and upper or lower limbs paresthesias or dysesthesias in one patient each. In two patients (patient 6 and patient 9) the lumbar puncture was not carried out because of their critical status. All except one patient displayed atypical lymphocytes in the CSF, consistent with the diagnosis of MCL. The latter patient (patient 7) was diagnosed with CNS involvement based on the clinical symptoms that improved after intrathecal therapy. In two patients, the flow cytometry analysis of CSF showed a characteristic MCL population (monoclonal B cells CD5 positive, CD23 negative, strong CD20, with relatively intense surface restricted light chain expression). CT or MRI scans were carried out in three patients with negative results in all cases. Three of the 10 patients who developed CNS infiltration during the course of the disease had received chemotherapy containing high-dose MTX (first-line in two cases; salvage therapy in one). At the time of CNS infiltration, five patients were under treatment and the remaining five patients had progressive disease.

risk and factors predicting CNS involvement

The risk of CNS involvement at 5 years was 26% (0.95 CI 10% to 42%) (Figure 1). CNS infiltration was more frequently observed in patients with blastoid histology ($P = 0.005$) (Figure 2A), Ki-67 expression $\geq 50\%$ ($P = 0.017$) (Figure 2B), high LDH serum level ($P = 0.006$) (Figure 2C) or intermediate- and high-risk IPI ($P = 0.05$) (Figure 2D). Extranodal

Table 2. Clinical features at diagnosis and outcome of 11 patients with MCL who developed CNS involvement

Patient number	Age/sex	Histological subtype	Stage	IPI	First-line treatment	Response
1 ^a	65/F	Typical, diffuse	IVA	H	Hyper-CVAD	Fa
2	61/F	Blastoid	IVA	H	CHOP	PR
3	54/M	Blastoid	IVA	I/H	Hyper-CVAD	Fa
4	63/M	Blastoid	IVA	I/H	CHOP	PR
5	63/M	Blastoid	IVB	H	CHOP	Fa
6	54/M	Typical, diffuse	IVB	H	CHOP	Fa
7	53/M	Blastoid, pleomorphic	IVA	L/I	Hyper-CVAD	PR
8	63/F	Typical, diffuse	IIIB	L/I	CHOP	CR
9	70/M	Typical, nodular	IVA	L/I	CHOP	CR
10	47/F	Typical, diffuse	IVB	I/H	CHOP	Fa
11	51/F	Typical, diffuse	IVA	L/I	Chlorambucil + prednisone	PR

MCL, mantle cell lymphoma; CNS, central nervous system; IPI, International Prognostic Index; F, female; H, high; Hyper-CVAD, cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone, high-dose methotrexate, cytarabine; Fa, failure; CHOP, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone; PR, partial response; M, male; I/H, intermediate/high; L/I, low/intermediate; CR, complete response.

^aCNS involvement at diagnosis.

involvement of ≥ 2 sites showed a trend to higher risk ($P = 0.06$). The treatment given to the patients (high-dose MTX regimens versus other) did not show predictive value for

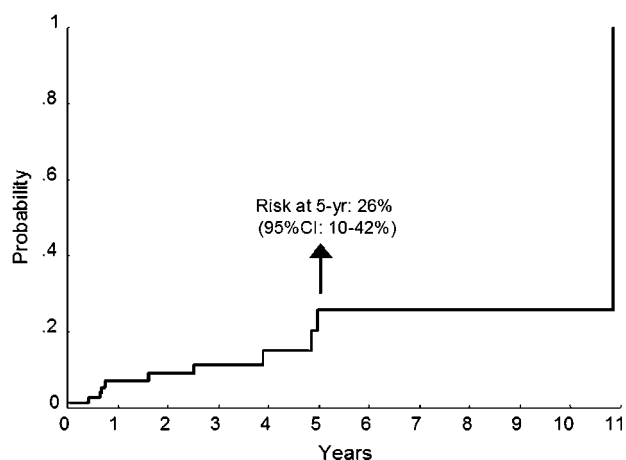


Figure 1. Risk of central nervous system involvement in 82 patients with mantle cell lymphoma.

CNS involvement. In a multivariate analysis including the histologic subtype (blastoid versus nonblastoid), LDH serum level (normal versus high), and extranodal sites involved (< 2 versus ≥ 2), the histologic subtype [$P = 0.03$; relative risk (RR): 4.8] and LDH serum level ($P = 0.02$; RR: 4.8) were the most important variables to predict CNS involvement. Given the number of missing data, Ki-67 immunohistochemistry staining was not included in the model. When the IPI (low versus low intermediate versus intermediate high versus high) was included in the analysis, histology and LDH levels retained their prognostic significance.

treatment and outcome of the patients

The most relevant features of patients developing CNS involvement are summarized in Table 3. All but two patients (patient 6 and patient 9) were treated with intrathecal chemotherapy (MTX 10 mg, hydrocortisone 20 mg, cytarabine 30 mg). In addition, seven patients (patients 1–5, 7, and 11) received combination chemotherapy that included high-dose MTX in four cases (patients 1, 2, 5, and 7).

All the patients with CNS infiltration died, with a median survival from the time of CNS involvement of 3 months

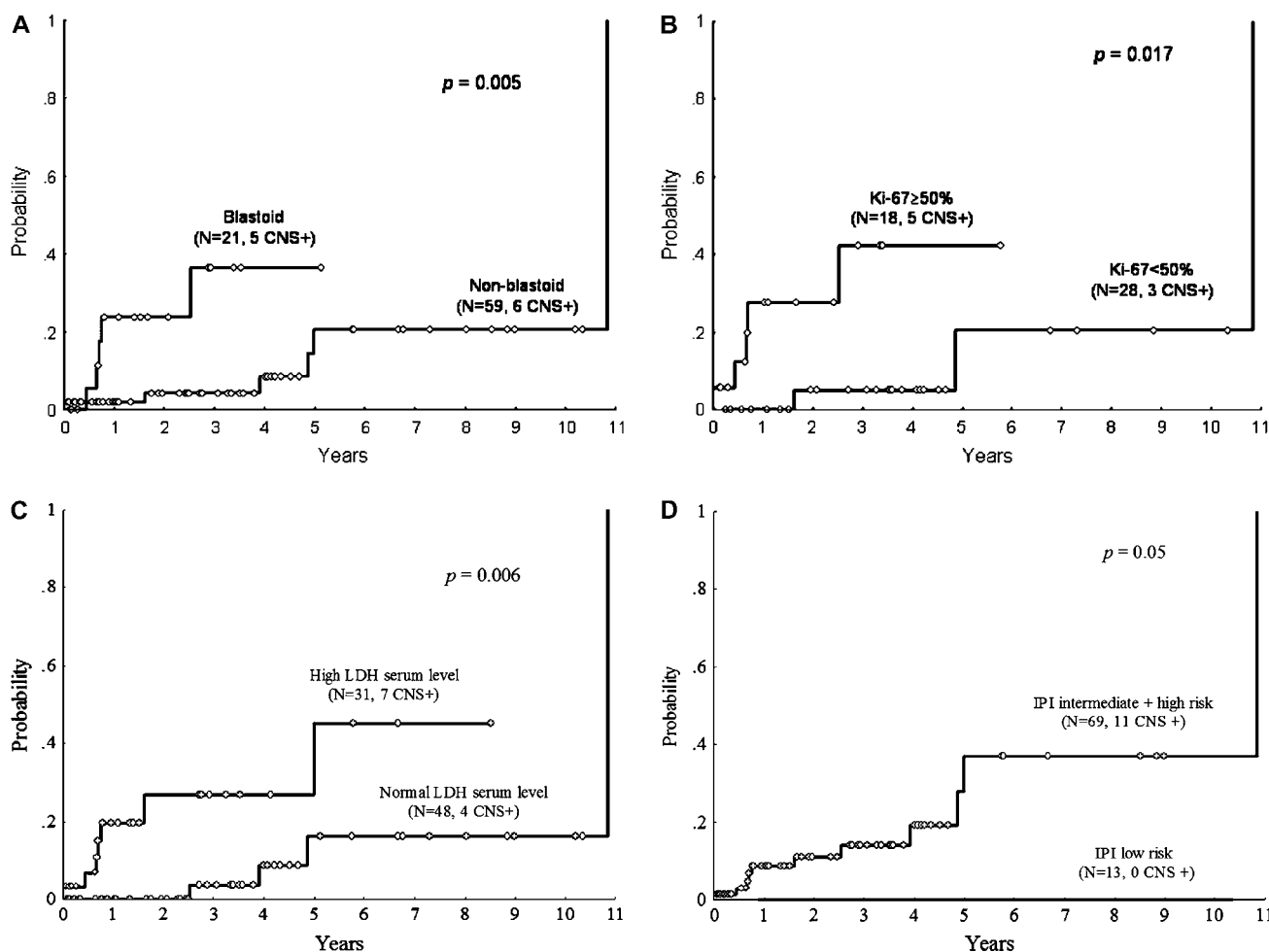


Figure 2. Risk of central nervous system involvement according to: (A) histological subtype of mantle cell lymphoma (nonblastoid versus blastoid variant), (B) Ki-67 expression ($< 50\%$ versus $\geq 50\%$), (C) serum lactate dehydrogenase levels, and (D) International Prognostic Index for aggressive lymphomas.

Table 3. Clinical features of CNS involvement in 11 patients with MCL

Patient number	Symptoms	Documentation of CNS	Time from diagnosis (months)	Status of MCL	Survival after CNS infiltration (months)
1 ^a	None	CSF: + CT: ND	0	Diagnosis	1.2
2	Confusional syndrome	CSF: + CT: ND	5.2	Under therapy	9
3	Paresthesias, lumbar hypoesthesia	CSF: + CT: ND	8	Under therapy	0.4
4	Facial palsy, upper limbs polyradiculoneuropathy	CSF: + CT: normal	8.3	Under therapy	5
5	Facial palsy, sciatalgia	CSF: + CT: ND	9	Under therapy	15
6	Diplopia, sciatalgia, trigeminal hypoesthesia	CSF: ND CT: ND	19	PD	0.2
7	Facial palsy, trigeminal paresthesias, lower limbs dysesthesias	CSF: – CT: normal	31	PD	13
8	Sciatalgia, paraparesis	CSF: + CT: ND	47	Under therapy	19
9	Diplopia	CSF: ND CT: normal	58	PD	0.7
10	Facial palsy	CSF: + CT: ND	60	PD	0.6
11	Sciatalgia	CSF: + CT: ND	130	PD	6

^aCNS infiltration at diagnosis.

CNS, central nervous system; MCL, mantle cell lymphoma; CSF, cerebrospinal fluid; +, presence of atypical lymphocytes; CT, computed tomography; ND, not done; –, absence of atypical lymphocytes.

(range, 5 days to 19 months). The cause of death was systemic progression of MCL in all cases but in one case (patient 1 died of sepsis). To analyze the impact of CNS infiltration on OS, we first carried out a raw comparison between the median OS of patients with and without CNS involvement (24 versus 29 months, respectively; $P > 0.1$, NS). Subsequently, CNS infiltration was analyzed as a time-dependent variable; patients developing CNS involvement showed a significantly poorer OS ($P < 0.001$; RR: 4.7).

discussion

The reported incidence of CNS involvement in patients with lymphoma varies from 2% to 27% in different series [15–22]. This wide variation is most likely explained by patients' inclusion criteria, different histologic subtypes, and methods to assess CNS infiltration [23]. In some aggressive lymphomas, such as lymphoblastic lymphoma or Burkitt's lymphoma, CNS infiltration is a well-known feature in the natural history of the disease, whereas, on the contrary, CNS infiltration is virtually absent in indolent lymphomas and, if present, it is usually related to histologic transformation [24, 25]. The incidence in different studies of CNS involvement in patients with MCL is also highly variable, ranging from 4% to 22%. The first reports describing this complication were published two decades ago [7, 8]. Subsequently, other series describing the presenting and evolutive features of patients with MCL were reported but in all these studies little attention was paid

to CNS disease, this being considered an infrequent event with an incidence inferior to 10%. As a result, CNS assessment has not been part of the routine initial work-up in patients with MCL.

In the present series, CNS involvement was found in one of 62 asymptomatic patients at diagnosis (1.6%). In all, 11 of 82 patients developed CNS infiltration during their clinical course, with an actuarial risk at 5 years of 26%. Discrepancies between our series and others are not easy to explain, but they could be due in part to differences in the duration of the follow-up. Risk factors for a higher probability of CNS involvement were blastic subtype, high Ki-67 immunostaining, high serum LDH levels, and high-risk IPI. Of note, most of these variables are in fact related to the proliferation of the disease.

The most frequent clinical manifestations of CNS involvement included signs and symptoms related to high intracranial pressure or meningeal infiltration, and mainly consisted in mental status changes, headache, and cranial nerve palsies. Nevertheless, signs and symptoms of CNS involvement may be very subtle, warranting a high degree of suspicion of CNS infiltration.

The mechanisms by which MCL involves the CNS are not completely understood. The possibility of histological transformation into a more aggressive lymphoma type or of progression from typical to blastoid histology cannot be completely ruled out. However, none of our six patients diagnosed with typical MCL presented with signs to suspect

such an event and, in addition, three of them showed lymphoid cells of typical MCL in the CSF. On the other hand, it is well known that cellular adhesion molecules (CAM) are involved in the pattern of growth and dissemination of lymphoproliferative disorders [26–30]. MCL is characterized by low levels or absence of L-selectin and CD11c, low expression of CD11a/CD18 (Leukocyte function antigen (LFA)-1), and high levels of CD44, CD54 (Intracellular adhesion molecule-1), and VLA-5 [31, 32]. In this regard, the lack of expression of LFA-1 has been related to lymphoma dissemination and aggressive behavior [30, 33]. Moreover, the strong expression of VLA-5 has been associated with extranodal involvement [30]. However, no correlation between the pattern of CAM and CNS involvement has been found yet in MCL [9].

In MCL, CNS involvement is usually a late event (median time from diagnosis of 25 months in the present series). Due to this fact, CNS infiltration could be overlooked in studies with short follow-up. The relatively high risk of CNS infiltration in MCL leads to the question of whether or not treatment strategies in this type of lymphoma should take into consideration such a complication. In this regard, CNS prophylaxis is recommended in patients with lymphoma and a high risk for this complication, although its usefulness has not been completely demonstrated [16]. The situation in MCL is even further complicated because of a number of factors. First, CNS infiltration is a late event in the course of the disease that is usually found in the context of relapsing or refractory disease. Secondly, the incidence of CNS infiltration observed in this series in patients receiving high-dose MTX-containing regimens was exactly the same than that detected in the remaining patients. Thirdly, the cause of death was systemic progression of the disease in all cases. What is necessary, therefore, are more effective treatments to control the disease as a whole and to prevent relapse. In practical terms, the present results support to carry out CNS prophylaxis only in those patients of high risk, namely those with blastoid MCL or high LDH serum levels. In fact, this is the current policy in our department.

In conclusion, CNS involvement is a frequent complication in patients with MCL. Blastoid histology, high proliferative index measured by Ki-67 immunostaining, high serum LDH or intermediate and high-risk IPI are associated with a higher risk to develop this complication. The fact that in most cases CNS involvement occurs late in the course of the disease as part of a generalized clinical relapse or progression indicates that better therapies for MCL are urgently needed. Whether there is a role for CNS prophylaxis in patients with MCL should be investigated as part of potentially more effective treatments for this type of lymphoma.

funding

Spanish Ministry of Health (FIS PI 03/0473, V-2006-RET2051-0 (Red de Cáncer)).

references

1. Swerdlow SH, Berger F, Isaacson PI et al. In Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press 2001; 168–170.
2. Weisenburger DD, Armitage JO. Mantle cell lymphoma—an entity comes of age. *Blood* 1996; 87(11): 4483–4494.
3. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ et al. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 1997; 89(6): 2067–2078.
4. Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E et al. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 1998; 82(3): 567–575.
5. Weisenburger DD, Vose JM, Greiner TC et al. Mantle cell lymphoma. A clinicopathologic study of 68 cases from the Nebraska Lymphoma Study Group. *Am J Hematol* 2000; 64(3): 190–196.
6. Witzig TE. Current treatment approaches for mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23(26): 6409–6414.
7. Bedotto J, Spier CM, Paquin ML et al. Mantle zone lymphoma with central nervous system involvement. *Cancer* 1986; 58(9): 2125–2129.
8. Ellison DJ, Turner RR, Van AR et al. High-grade mantle zone lymphoma. *Cancer* 1987; 60(11): 2717–2720.
9. Montserrat E, Bosch F, Lopez-Guillermo A et al. CNS involvement in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1996; 14(3): 941–944.
10. Oinonen R, Franssila K, Elonen E. Central nervous system involvement in patients with mantle cell lymphoma. *Ann Hematol* 1999; 78(3): 145–149.
11. Valdez R, Kroft SH, Ross CW et al. Cerebrospinal fluid involvement in mantle cell lymphoma. *Mod Pathol* 2002; 15(10): 1073–1079.
12. Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation for incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457–481.
13. Mantel N, Byar DP. Evaluation of response time data involving transient states: an illustration using heart-transplant data. *J Am Stat Assoc* 1974; 69: 81–86.
14. Khouri IF, Romaguera J, Kantarjian H et al. Hyper-CVAD and high-dose methotrexate/cytarabine followed by stem-cell transplantation: an active regimen for aggressive mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1998; 16(12): 3803–3809.
15. Bashir RM, Bierman PJ, Vose JM et al. Central nervous system involvement in patients with diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Oncol* 1991; 14(6): 478–482.
16. Bos GM, van Putten WL, van der HB et al. For which patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma is prophylaxis for central nervous system disease mandatory? Dutch HOVON Group. *Ann Oncol* 1998; 9(2): 191–194.
17. van Besien K, Ha CS, Murphy S et al. Risk factors, treatment, and outcome of central nervous system recurrence in adults with intermediate-grade and immunoblastic lymphoma. *Blood* 1998; 91(4): 1178–1184.
18. Lopez-Guillermo A, Cid J, Salar A et al. Peripheral T-cell lymphomas: initial features, natural history, and prognostic factors in a series of 174 patients diagnosed according to the R.E.A.L. Classification. *Ann Oncol* 1998; 9(8): 849–855.
19. Bishop PC, Wilson WH, Pearson D et al. CNS involvement in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1999; 17(8): 2479–2485.
20. Haioun C, Besson C, Lepage E et al. Incidence and risk factors of central nervous system relapse in histologically aggressive non-Hodgkin's lymphoma uniformly treated and receiving intrathecal central nervous system prophylaxis: a GELA study on 974 patients. *Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. Ann Oncol* 2000; 11(6): 685–690.
21. Hollender A, Kvaloy S, Nome O et al. Central nervous system involvement following diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma: a risk model. *Ann Oncol* 2002; 13(7): 1099–1107.
22. Feugier P, Virion JM, Tilly H et al. Incidence and risk factors for central nervous system occurrence in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma: influence of rituximab. *Ann Oncol* 2004; 15(1): 129–133.
23. Montoto S, Lister TA. Secondary central nervous system lymphoma: risk factors and prophylaxis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005; 19(4): 751–763.
24. Bollen EL, Brouwer RE, Hamers S et al. Central nervous system relapse in non-Hodgkin lymphoma. A single-center study of 532 patients. *Arch Neurol* 1997; 54(7): 854–859.

25. Jahnke K, Thiel E, Martus P et al. Retrospective study of prognostic factors in non-Hodgkin lymphoma secondarily involving the central nervous system. *Ann Hematol* 2006; 85(1): 45–50.
26. Bashir R, Coakham H, Hochberg F. Expression of LFA-1/ICAM-1 in CNS lymphomas: possible mechanism for lymphoma homing into the brain. *J Neurooncol* 1992; 12(2): 103–110.
27. Kern WF, Spier CM, Hanneman EH et al. Neural cell adhesion molecule-positive peripheral T-cell lymphoma: a rare variant with a propensity for unusual sites of involvement. *Blood* 1992; 79(9): 2432–2437.
28. Moller P, Eichelmann A, Koretz K, Mechttersheimer G. Adhesion molecules VLA-1 to VLA-6 define discrete stages of peripheral B lymphocyte development and characterize different types of B cell neoplasia. *Leukemia* 1992; 6(4): 256–264.
29. Jacob MC, Agrawal S, Chaperot L et al. Quantification of cellular adhesion molecules on malignant B cells from non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 1999; 13(9): 1428–1433.
30. Terol MJ, Lopez-Guillermo A, Bosch F et al. Expression of beta-integrin adhesion molecules in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinical and evolutive features. *J Clin Oncol* 1999; 17(6): 1869–1875.
31. Angelopoulou MK, Kontopidou FN, Pangalis GA. Adhesion molecules in B-chronic lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol* 1999; 36(2): 178–197.
32. Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Vassilakopoulos TP et al. The splenic form of mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2002; 68(1): 12–21.
33. Medeiros LJ, Weiss LM, Picker LJ et al. Expression of LFA-1 in non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 1989; 63(2): 255–259.

IV. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los trabajos que integran esta tesis han permitido profundizar en el conocimiento biológico y clínico del LCM. Hasta el momento de su inicio no existían estudios relacionados con el efecto de fármacos citotóxicos en células de LCM ni sobre la existencia de posibles anomalías en las vías de apoptosis en esta entidad. Por consiguiente, no se disponía de evidencias de que alteraciones en este sentido pudieran contribuir a su desarrollo ni a la heterogeneidad observada en la evolución de estos pacientes. Desde el punto de vista clínico, la expresión hemoperiférica y la infiltración del SNC no se encontraban suficientemente caracterizadas debido fundamentalmente al número limitado de pacientes estudiados y a la disparidad en los criterios utilizados en su valoración.

En los trabajos que constituyen la presente tesis se analizaron los mecanismos de apoptosis en líneas celulares portadoras de la $t(11;14)(q13;q32)$ y en células primarias de LCM. Asimismo, se estudió la incidencia, los factores determinantes y el impacto pronóstico de la expresión hemoperiférica y la infiltración del SNC en el LCM.

Efecto citotóxico de mitoxantrona, fludarabina y mafosfamida en líneas celulares portadoras de la t(11;14)(q13;q32) y en células primarias de LCM

Con objeto de analizar los mecanismos de apoptosis en el LCM, se incubaron células de cuatro líneas celulares portadoras de la t(11;14)(q13;q32) (JVM-2, REC-1, Granta 519 y NCEB-1) y de pacientes afectados de LCM con tres fármacos citotóxicos, fludarabina, mitoxantrona y mafosfamida, forma activa de la ciclofosfamida tras su metabolismo hepático. Estos tres fármacos fueron seleccionados fundamentalmente por su utilización habitual en el tratamiento de diversos SLPC-B, por la diversidad en sus mecanismos de acción y por la amplia experiencia de nuestro grupo en estudios *in vitro* con estos mismos fármacos en células de LLC.

La mitoxantrona, inhibidor de la topoisomerasa II, fue el fármaco que indujo el mayor efecto citotóxico en las células de las líneas JVM-2, REC-1 y Granta 519, así como en las células primarias de todos los pacientes estudiados. La LD₅₀ (*dosis letal "50"*, concentración de fármaco que reduce la viabilidad celular a un 50%) fue, en todos los casos, inferior a la observada en estudios previos realizados en células primarias de LLC.³⁹¹ El mecanismo de acción de los inhibidores de la topoisomerasa II se basa en la interferencia con la actividad de la enzima en su unión a las roturas de la doble hélice de ADN. Los mecanismos de resistencia a estos agentes parecen ser independientes del transporte del fármaco y de alteraciones en la interacción entre el fármaco y la topoisomerasa II.³⁹² Por el contrario, sí parecen estar íntimamente

relacionados con la expresión disminuida de enzima.³⁹³ Rosenwald y cols. han descrito recientemente que el gen de la topoisomerasa II es uno de los numerosos genes relacionados con la proliferación tumoral que constituyen la firma génica del LCM.⁶⁹ Asimismo, la expresión de topoisomerasa II α no sólo es un buen marcador de proliferación celular sino, además, un factor pronóstico excelente.³⁸⁸ De acuerdo con ello, nuestros resultados mostraron un efecto citotóxico superior de la mitoxantrona en las líneas celulares y en los LCM blásticos que en los casos típicos, menos proliferativos. Cabe destacar, sin embargo, que en la línea celular NCEB-1 no se observó ningún efecto citotóxico tras la incubación con los fármacos mencionados. Al analizar la distribución celular en las distintas fases del ciclo y su contenido en ADN, las células de la línea NCEB-1 en presencia de mitoxantrona experimentaron una parada de ciclo en la transición de la fase S a G₂-M, sin que en ningún momento se observara el pico en fase sub-G₀ que corresponde a las células en apoptosis, ni tan siquiera tras periodos de incubación prolongados. Estos resultados coinciden con los observados en un estudio previo realizado por Bailly y cols.,³⁹² en el que los mecanismos de muerte celular fueron diferentes para células sensibles y resistentes a la mitoxantrona, y se caracterizaron por la rápida inducción de apoptosis en las primeras y la inducción de un bloqueo del ciclo celular en G₂-M seguido de una pérdida progresiva de viabilidad celular hasta la muerte por necrosis en las resistentes.

La fludarabina, análogo de las purinas efectivo en el tratamiento de la LLC y el LF, tan sólo indujo un efecto citotóxico menor a dosis altas en las

líneas celulares JVM-2, REC-1 y Granta 519. La línea NCEB-1 se mostró resistente y sólo en un paciente se detectó una discreta citotoxicidad con la utilización de elevadas concentraciones de fármaco y tras un periodo de incubación prolongado. En la actualidad es un hecho conocido que la escasa respuesta del LCM a la fludarabina es debida a una incorporación deficiente del fármaco a las células³⁹⁴ y que este fenómeno está relacionado con los niveles de expresión relativamente disminuidos del transportador equilibrativo de nucleósidos hENT2.³⁹⁵ En este sentido, los niveles de hENT2 presenta una excelente correlación con la sensibilidad *in vitro* de las células de la LLC a la fludarabina,³⁹⁶ a su vez relacionados con la respuesta clínica de los pacientes a regímenes que contienen este fármaco.^{397,398}

Apoptosis inducida por fármacos en las líneas celulares sensibles y en las células primarias de LCM

En las células de las líneas JVM-2, REC-1 y Granta 519, así como en las células primarias de todos los pacientes estudiados, la incubación con los fármacos citotóxicos se acompañó de una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, cambio de conformación de BAX y BAK, y activación de las caspasas 9 y 3. En todos los casos se observó, asimismo, activación de caspasa 8, en relación probablemente a la existencia de un bucle en el que estarían implicadas las caspasas 9 y 3, o debido a la activación de otras caspasas situadas en un nivel previo a la mitocondria. La inhibición completa de la

apoptosis observada tras la utilización del inhibidor universal de caspasas Z-VAD demostró que la muerte celular inducida por los fármacos utilizados estaba mediada por la activación de caspasas y, por tanto, era debida a la inducción de apoptosis. Tan sólo los cambios conformacionales de BAX y BAK tuvieron lugar de manera completamente independiente a la activación de caspasas, tal como ya se había descrito en células de LLC.³⁹⁹

Expresión de proteínas proapoptóticas, antiapoptóticas e inhibidoras de la apoptosis en el LCM

Los estudios realizados mediante *Western blot* mostraron que las células de LCM expresan, en condiciones basales, las proteínas antiapoptóticas BCL-2 y BCL-X_L, las proapoptóticas BAX y BAK, y las proteínas inhibidoras de la apoptosis XIAP y survivina. Además de inducir un cambio de conformación de BAX y BAK, la incubación con fármacos citotóxicos se acompañó de una disminución franca de los niveles de expresión de MCL-1 y XIAP y, en menor medida, de BCL-X_L. El papel central que desempeñan los miembros de la familia de BCL-2 en la regulación de la vía mitocondrial de apoptosis es un hecho perfectamente conocido. La incubación de células de LLC con diversos fármacos citotóxicos se acompaña, de manera similar a lo observado en nuestro trabajo, de un descenso en los niveles de expresión de MCL-1,^{397,400,401} hecho que también se ha descrito en células de mieloma múltiple tratadas con diversos agentes citotóxicos.⁴⁰²⁻⁴⁰⁶ Un estudio reciente ha mostrado que el descenso en la expresión de MCL-1 en células de LLC es

capaz de inducir la apoptosis de dichas células de manera rápida y eficaz, siendo además capaz de abolir el efecto antiapoptótico que ocasiona la estimulación mantenida del receptor de células B (BCR).⁴⁰⁷ Recientemente se ha sugerido que MCL-1 podría ser una diana terapéutica relevante en leucemia aguda linfoblástica y LLC, y que la disminución en sus niveles de expresión potenciaría el efecto de rituximab.⁴⁰⁸ En cuanto al LCM, la inhibición de la vía de señalización de mTOR, activada constitutivamente en esta entidad, se asocia a una disminución de los niveles de expresión de ciclina D1, MCL-1 y BCL-X_L, entre otros.⁴⁰⁹ MCL-1 parece desempeñar un papel relevante en el inicio de la apoptosis en el LCM tras el tratamiento con flavopiridol.³⁷⁹ La disminución en los niveles de BCL-X_L se ha descrito, asimismo, tras la incubación de células de LCM con inhibidores de NF-κB.³⁶⁷ Por el contrario, no existen estudios sobre la modulación de XIAP en la apoptosis inducida por fármacos en el LCM, aunque el marcado descenso en el nivel de esta proteína, entre otras, se ha descrito como uno de cambios observados al incubar líneas celulares de LNH con bendamustina y cladribina, fármacos de acción sinérgica.⁴¹⁰ La disminución en los niveles de XIAP parece desempeñar un papel clave en el sinergismo observado en líneas celulares de leucemia aguda mielomonocítica y prolinfocítica T tras su exposición a flavopiridol y TRAIL.⁴¹¹ así como en la sensibilidad al bortezomib observada *in vitro* en líneas de linfoma de Hodgkin.⁴¹²

La ausencia de apoptosis observada en NCEB-1 no es debida a alteraciones en la maquinaria implicada en la vía mitocondrial

NCEB-1 fue la única línea celular en la que no se observó ningún efecto citotóxico tras la incubación con fármacos, ni siquiera al utilizar concentraciones superiores a las farmacológicas, periodos de incubación más prolongados o combinaciones de agentes citotóxicos. Sin embargo, los niveles basales de expresión de caspasas, proteínas con función proapoptótica y antiapoptótica e IAPs no mostraron diferencias respecto del resto de líneas celulares estudiadas. Asimismo, la exposición de las células NCEB-1 a la estaurosporina, inductora de apoptosis por activación directa de la vía mitocondrial,⁴¹³ se acompañó de todas las alteraciones propias de la muerte celular por apoptosis. La ausencia de respuesta a los agentes genotóxicos utilizados quizás pueda ser explicada por la existencia de alteraciones en los mecanismos reguladores de la apoptosis situados en un nivel anterior a los miembros de la familia de BCL-2 analizados en nuestro estudio y/o por la presencia de alteraciones en los genes de respuesta a daño al ADN de los que la línea NCEB-1 es portadora. En este sentido, las células de esta línea poseen un cariotipo complejo, casi tetraploide, que incluye alteraciones en los genes *TP53* y *ATM*. La presencia de anomalías en *TP53* en pacientes afectados de LLC y LCM se asocia, de forma característica, a una respuesta escasa al tratamiento y a una supervivencia inferior; de manera similar, los enfermos con LLC y alteraciones en *ATM* también presentan un peor pronóstico. En condiciones normales, la apoptosis ocasionada por fármacos genotóxicos se acompaña de

una estabilización de p53, que tiene lugar tras su fosforilación por ATM. Debido al papel fundamental de estos genes en las vías de respuesta al daño al ADN, la disfunción simultánea de ambos podría explicar la ausencia de apoptosis en las células de la línea NCEB-1 tras su incubación con mitoxantrona, fludarabina y mafosfamida. De modo similar a lo observado en esta línea celular, la incubación de fibroblastos de ratón *ATM*^{-/-}*TP53*^{-/-} con inhibidores de las topoisomerasas I y II no desencadena la muerte celular por apoptosis.⁴¹⁴ Asimismo, la línea celular UPN2, portadora de alteraciones en *TP53* y *ATM*, es completamente resistente a la inducción de apoptosis tras la exposición a radiaciones ionizantes.⁴¹⁵ Lamentablemente, no pudimos disponer de ninguna muestra de células primarias portadora de alteraciones en *TP53* y *ATM* simultáneamente que nos permitiera corroborar los resultados observados en NCEB-1. En este sentido cabe destacar que no se ha encontrado una asociación preferente entre las alteraciones de *TP53* y *ATM*, lo que indica que no existe una ventaja selectiva para los LCM portadores de ambas aberraciones.⁸⁶⁻⁸⁸ Este hallazgo es, asimismo, compatible con la ausencia de comunicaciones sobre la asociación de deleciones de 17p13 y 11q22-23 en esta entidad.

Expresión hemoperiférica en el LCM

A pesar de que la posible leucemización del LCM es un hecho bien conocido, el porcentaje de pacientes que presentan expresión hemoperiférica

en el momento del diagnóstico varía enormemente según las diversas series publicadas y se sitúa entre el 13% y el 80%.^{28,44,56,57,416} Sin embargo, la mayoría de estas series incluyen relativamente pocos pacientes y no especifican los criterios utilizados para definir la presencia de leucemización, que varían desde la observación de algún linfocito morfológicamente atípico en sangre periférica hasta la consideración únicamente de aquellos casos con linfocitosis absoluta. Por otro lado, hasta el momento del inicio de los trabajos que integran esta tesis no existía ningún estudio en el que se hubiera analizado de manera sistemática la posible existencia de expresión hemoperiférica en el LCM mediante citometría de flujo y tan sólo se había comunicado algún caso aislado de enfermedad detectable mediante esta técnica en ausencia de sospecha morfológica de leucemización.⁵⁶

La revisión morfológica de las extensiones de sangre periférica realizadas al diagnóstico en 48 pacientes puso de manifiesto que 36 de ellos (75%) presentaban expresión hemoperiférica, definida por la presencia de más de 5% de linfocitos atípicos. Cabe destacar que 11 de estos pacientes presentaban menos de $5 \times 10^9/L$ linfocitos. En 8 de los 12 pacientes sin expresión leucémica aparente morfológicamente se observó una población linfoide B característica de LCM mediante citometría de flujo. Únicamente 4 pacientes (8% de la totalidad) tenían una biopsia medular normal y no presentaban alteraciones en los estudios morfológicos e inmunofenotípicos de sangre periférica.

Alteraciones cromosómicas en los LCM leucemizados

En 27 de los 48 casos incluidos se pudieron llevar a cabo estudios de CGH. De estos 27 pacientes, 23 presentaban expresión hemoperiférica morfológicamente aparente, en 3 casos ésta era detectable mediante citometría de flujo únicamente y en un paciente el estudio citológico e inmunofenotípico eran normales. El 93% de los enfermos presentaban alteraciones cromosómicas, con una media de $5,7 \pm 4,4$ por muestra, y un número elevado de ganancias ($n=86$) y pérdidas ($n=69$). Las ganancias cromosómicas más frecuentes se localizaron en 3q, 7p, 8q, 9q, 12q y 13q. Once regiones diferentes mostraban amplificaciones, siendo la región 18q22- qter la amplificada con mayor frecuencia. Las pérdidas más frecuentes fueron las de 13q, 1p, 11q, 9p, 10p, 17p, 6q, 8p y 9q. Los pacientes con pérdida de 17p presentaron un mayor número de alteraciones cromosómicas que aquellos con normalidad del cromosoma 17. No se observaron diferencias significativas al comparar el grupo de pacientes con leucemización morfológica ($n=23$) respecto del resto de pacientes ($n=4$). Sin embargo, el grupo de enfermos con un recuento linfocitario $\geq 5 \times 10^9/L$ mostró ganancias de 3q y pérdidas de 10p con mayor frecuencia que los pacientes con menos de $5 \times 10^9/L$ linfocitos.

Las alteraciones cromosómicas detectadas en nuestro estudio son totalmente concordantes con las descritas previamente. El hecho de no haber observado diferencias en el patrón de ganancias y pérdidas entre los casos de LCM con y sin leucemización morfológica aparente no es en absoluto

sorprendente, ya que todos excepto un enfermo presentaban enfermedad detectable mediante citometría de flujo. Por el contrario, los pacientes con un recuento linfocitario $\geq 5 \times 10^9/L$ presentaron más frecuentemente ganancias de 3q23-qter y pérdidas de 10p14-pter. La elevada frecuencia de ganancias de 3q en el LCM es un hecho bien conocido. Cabe destacar que recientemente se ha demostrado que esta alteración tiene un valor pronóstico independiente del perfil de expresión génica relacionado con la proliferación tumoral.³⁹⁰ Por el contrario, a diferencia de algunos estudios que refieren una mayor frecuencia de pérdidas de 8p en enfermos con LCM leucemizado que en pacientes con enfermedad ganglionar localizada,^{92,417} esta alteración presentó una distribución similar en ambos grupos de pacientes, tanto al considerar la existencia de leucemización morfológica como al tener en cuenta el recuento linfocitario. Estas diferencias con otras publicaciones podrían ser debidas a los diferentes criterios usados para definir la leucemización.

Leucemización y pronóstico

La presencia de expresión hemoperiférica detectable morfológicamente se asoció, en nuestro estudio, a un mal estado general al diagnóstico (ECOG ≥ 2), existencia de esplenomegalia palpable y un recuento plaquetario inferior a $120 \times 10^9/L$. Además, los pacientes con linfocitosis $\geq 5 \times 10^9/L$ presentaron con mayor frecuencia una cifra de Hb < 100 g/L, peor respuesta al

tratamiento y una supervivencia inferior que los enfermos con un recuento linfocitario inferior a $5 \times 10^9/L$.

Diversos factores biológicos y clínicos han demostrado su importancia pronóstica en el LCM. Entre los primeros, la morfología blastoide, el patrón de infiltración difuso, el índice proliferativo elevado y las anomalías de *TP53* se han asociado en diversos estudios a una supervivencia inferior. La edad superior a 60 años, el mal estado general al diagnóstico, la presencia de esplenomegalia, la cifra elevada de LDH y la anemia se han asociado, asimismo, a un pronóstico desfavorable. Sin embargo, el impacto pronóstico de la leucemización es controvertido. La presencia de expresión hemoperiférica ha demostrado tener implicación pronóstica en algunos estudios.^{28,44,46,383,384} En este sentido, la presencia de leucocitosis y linfocitosis absoluta al diagnóstico se ha asociado a una menor supervivencia si bien en otros trabajos no se han observado diferencias entre los pacientes con LCM leucemizado y los enfermos con enfermedad únicamente ganglionar.^{56,62} En nuestro estudio no se observaron diferencias entre ambos grupos de pacientes al considerar la existencia de leucemización morfológica aunque los enfermos con linfocitosis $\geq 5 \times 10^9/L$ presentaron, por el contrario, un peor pronóstico.

Infiltración del SNC en el LCM

La incidencia de infiltración del SNC en el LNH oscila entre 2,2% y 27%, según las diversas series.⁴¹⁸⁻⁴²³ Estas diferencias están relacionadas con los distintos subtipos histológicos incluidos en los distintos estudios, los criterios utilizados para definir la existencia de infiltración del SNC, la inclusión de pacientes al diagnóstico o en recaída y la utilización o no de profilaxis de la infiltración del SNC. La afección del SNC al diagnóstico es un hecho frecuente en determinados subtipos histológicos, principalmente el linfoma de Burkitt y el linfoma linfoblástico,⁴²⁴ que se observa asimismo con elevada frecuencia en el linfoma T-NK nasal⁴²² y el linfoma de células grandes B primario del mediastino,⁴²⁰ este último con marcada tendencia a infiltrar territorios extraganglionares. La afección de territorios extraganglionares es, asimismo, un hecho extremadamente frecuente en el LCM. La infiltración del SNC en esta entidad fue descrita en 1986 por Bedotto y cols.⁴²⁵ y Ellison y cols.⁴²⁶ Posteriormente se publicaron diversas series sobre los datos clínicos al diagnóstico y evolutivos en pacientes afectados de LCM, en las que la infiltración del SNC se consideraba una complicación infrecuente. Por este motivo, la evaluación del SNC no ha formado parte de la valoración inicial de los pacientes con LCM durante años.

En nuestra serie, 11 de 82 pacientes (13%) presentaron afección del SNC. En una paciente sin sintomatología neurológica la infiltración del SNC fue detectada en la punción lumbar realizada durante el estadiaje inicial (1/82,

1,2%). Esta prueba forma parte de la valoración rutinaria de los pacientes con LCM en el momento del diagnóstico en numerosos centros (entre ellos el Hospital Clínic) desde que Montserrat y cols. describieron una incidencia de infiltración del SNC del 22% en esta entidad.⁴²⁷ Los 10 pacientes restantes desarrollaron esta complicación durante la evolución de la enfermedad, tras una mediana de 25 meses desde el diagnóstico (5-130 meses). Todos ellos presentaron clínica neurológica, principalmente parálisis de pares craneales (54%), alteraciones sensitivas en el área lumbar y trastornos sensitivomotores en las extremidades inferiores. En este sentido, las manifestaciones clínicas más frecuentes en los pacientes afectados de LNH que desarrollan infiltración del SNC se relacionan con la presencia de infiltración meníngea o el aumento de presión intracraneal e incluyen, además de la parálisis de uno o más pares craneales, cefalea y cambios en el comportamiento, en ocasiones sutiles.

En todos los pacientes en que se pudo llevar a cabo la punción lumbar, excepto en uno, se constató la presencia de linfocitos atípicos en el líquido cefalorraquídeo. Por el contrario, en ninguno de los casos en que se realizaron pruebas de imagen se detectó afección parenquimatosa del SNC. En este sentido, los criterios diagnósticos precisos de infiltración del SNC en el LNH no están bien establecidos y prácticamente todas las series publicadas incluyen pacientes con sintomatología neurológica pero análisis del LCR y pruebas de imagen negativos. Por otro lado, en algunos casos puede resultar imposible confirmar citológicamente la afección del SNC aun existiendo evidencia radiológica de infiltración leptomeníngea.⁴²⁰ La infiltración meníngea

constituye la principal localización de enfermedad en el SNC en la mayoría de LNH, con la excepción, posiblemente, del linfoma primario del mediastino, cuyo comportamiento es más parecido al de los tumores sólidos que a los linfomas.⁴²⁰

En cuanto al momento del desarrollo de la infiltración del SNC, 5 de nuestros pacientes estaban realizando tratamiento intensivo y los 5 restantes presentaban enfermedad progresiva. Tres de los 10 enfermos que desarrollaron esta complicación durante el curso evolutivo del LCM habían recibido tratamiento previo con metotrexato a altas dosis y profilaxis intratecal. Según las diferentes series publicadas, la infiltración del SNC en los LNH suele aparecer en el contexto de recidivas sistémicas.^{423,428} A pesar de ello, la infiltración del SNC puede presentarse de manera aislada si bien el pronóstico de los pacientes es igualmente desfavorable y su supervivencia no suele superar los 6 meses.^{418,428,429}

Riesgo y factores predictivos de infiltración del SNC

El riesgo actuarial de desarrollar infiltración del SNC fue, en nuestra serie, del 26%. Los factores de riesgo para el desarrollo de esta complicación fueron la histología blastoide, un índice proliferativo elevado (analizado mediante marcaje inmunohistoquímico con Ki-67), los niveles elevados de LDH sérica y un IPI de riesgo alto.

Numerosos factores se han asociado a un riesgo elevado de infiltración del SNC. Así, en la mayoría de estudios, la presencia de mal estado general, niveles elevados de LDH sérica, un estadio avanzado, la afección de una o más áreas extraganglionares y el IPI de riesgo alto se relacionan con un riesgo aumentado de recidiva en SNC. En algunas series, la afección de determinados territorios extraganglionares como médula ósea, órganos parenquimatosos (pulmón, hígado, mama o riñón, entre otros), piel y tejidos muscular y subcutáneo, se han asociado a un mayor riesgo de enfermedad en SNC. Cabe destacar que, en algunos trabajos, la presencia de infiltración sinusal o testicular no se ha asociado a un aumento de riesgo de desarrollar esta complicación.^{421,423}

Tratamiento y evolución de los pacientes con infiltración del SNC

Nueve de los 11 pacientes que presentaron infiltración del SNC recibieron tratamiento intratecal triple (metotrexato 10 mg, hidrocortisona 20 mg y citarabina 30 mg). De ellos, 7 recibieron además tratamiento quimioterápico sistémico que incluía metotrexato a dosis altas en 4 casos. Todos los pacientes que desarrollaron infiltración del SNC durante la evolución del LCM fallecieron por progresión sistémica de la enfermedad, con una supervivencia mediana desde el momento en que presentaron la complicación neurológica de 3 meses. La enferma en que se detectó la afección del SNC

durante el estadiaje inicial falleció durante el periodo de aplasia posterior al primer ciclo de quimioterapia a consecuencia de una sepsis.

Pese a que la supervivencia mediana de los pacientes que desarrollaron infiltración del SNC no mostró diferencias respecto a la de los pacientes que no la desarrollaron, al analizar esta complicación como variable tiempo-dependiente los enfermos que presentaron afección del SNC mostraron una supervivencia significativamente inferior al resto.

Dado el pésimo pronóstico que confiere la infiltración del SNC a los pacientes afectos de LNH en general y de LCM en particular, se han llevado a cabo diversas estrategias para prevenir el desarrollo de esta complicación. La eficacia de la profilaxis de la infiltración del SNC en el linfoma de Burkitt y el linfoma linfoblástico es evidente; sin embargo, su efectividad en otros subtipos histológicos no se ha demostrado por completo.⁴³⁰ Diversos trabajos, algunos de ellos no aleatorizados, han puesto de manifiesto que la utilización de dosis intermedias y altas de metotrexato o citarabina sistémicos así como la administración intratecal de metotrexato con o sin hidrocortisona disminuyen de manera significativa el riesgo de desarrollar infiltración del SNC.^{423,429,431,432}

El objetivo principal de la profilaxis de la infiltración del SNC es evitar la aparición de afección neurológica aislada. En el LCM, la infiltración del SNC tiene lugar en fases avanzadas de la enfermedad, en el contexto de recidivas

sistémicas o enfermedad refractaria, que es la causa final de muerte de los pacientes. Por otro lado, en la presente serie la incidencia de infiltración del SNC en pacientes tratados con metotrexato a dosis altas fue similar a la observada en el resto de pacientes. Lo que es necesario, por tanto, es desarrollar tratamientos más efectivos que permitan la erradicación inicial del LCM y disminuyan el riesgo de recidivas posteriores. El papel de la profilaxis del SNC quedaría reservado para los pacientes de alto riesgo para el desarrollo de esta complicación, es decir, aquellos enfermos con LCM blastoide o con niveles elevados de LDH sérica.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La citotoxicidad observada tras la incubación con mitoxantrona, fludarabina y mafosfamida en las líneas celulares sensibles y en las células primarias de LCM es debida a la inducción de apoptosis por activación de la vía mitocondrial.
2. La maquinaria implicada en la vía mitocondrial de apoptosis es funcional en el LCM pero para su completa activación requiere la integridad de los sensores de daño al ADN.
3. La inducción de apoptosis en el LCM se acompaña de una disminución en los niveles de expresión de las proteínas antiapoptóticas MCL-1 y BCL-X_L y de la proteína inhibidora de la apoptosis XIAP.
4. La expresión hemoperiférica detectada mediante citometría de flujo es un hecho prácticamente constante en el LCM, probablemente relacionado con el comportamiento biológico de esta entidad.
5. Los pacientes con LCM que presentan al diagnóstico linfocitosis igual o superior a $5 \times 10^9/L$ se caracterizan por presentar alteraciones cromosómicas diferenciales y un peor pronóstico.

6. La infiltración del SNC en el LCM es una complicación frecuente, principalmente en los pacientes con histología blastoide, índice proliferativo elevado, LDH sérica elevada e IPI de riesgo alto.

7. La infiltración del SNC suele ser un acontecimiento tardío en la evolución del LCM que aparece durante la progresión de la enfermedad o como parte de una recidiva generalizada. Por ello, el papel de la profilaxis de esta complicación debe ser investigado en el contexto de tratamientos iniciales más efectivos que los actuales.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Weisenburger, D. D., Kim, H. & Rappaport, H. Mantle-zone lymphoma: a follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma. *Cancer* **49**, 1429-1438 (1982).
2. Banks, P. M. *et al.* Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am. J. Surg. Pathol.* **16**, 637-640 (1992).
3. Zucca, E., Stein, H. & Coiffier, B. European Lymphoma Task Force (ELTF): Report of the workshop on Mantle Cell Lymphoma (MCL). *Ann. Oncol.* **5**, 507-511 (1994).
4. Harris, N. L. *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**, 1361-1392 (1994).
5. Swerdlow, S. H. *et al.* *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* IARC Press: Lyon 2001. Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H. & Vardiman, J. W. (eds.), pp. 168-170 (2001).
6. Tsujimoto, Y. *et al.* Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* **224**, 1403-1406 (1984).
7. Tsujimoto, Y. *et al.* Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* **315**, 340-343 (1985).
8. Motokura, T. *et al.* A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* **350**, 512-515 (1991).
9. Schuurin, E., Verhoeven, E., Mooi, W. J. & Michalides, R. J. Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene* **7**, 355-361 (1992).
10. Withers, D. A. *et al.* Characterization of a candidate bcl-1 gene. *Mol. Cell Biol.* **11**, 4846-4853 (1991).
11. Xiong, Y., Connolly, T., Futcher, B. & Beach, D. Human D-type cyclin. *Cell* **65**, 691-699 (1991).
12. Hummel, M., Tamaru, J., Kalvelage, B. & Stein, H. Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic

- mutations like the physiologic cells of the follicle mantle. *Blood* **84**, 403-407 (1994).
13. Du, M. Q. *et al.* Ongoing immunoglobulin gene mutations in mantle cell lymphomas. *Br. J. Haematol.* **96**, 124-131 (1997).
 14. Laszlo, T., Nagy, M., Kelenyi, G. & Matolcsy, A. Immunoglobulin V(H) gene mutational analysis suggests that blastic variant of mantle cell lymphoma derives from different stages of B-cell maturation. *Leuk. Res.* **24**, 27-31 (2000).
 15. Pittaluga, S. *et al.* Blastic variant of mantle cell lymphoma shows a heterogenous pattern of somatic mutations of the rearranged immunoglobulin heavy chain variable genes. *Br. J. Haematol.* **102**, 1301-1306 (1998).
 16. Thorselius, M. *et al.* Somatic hypermutation and V(H) gene usage in mantle cell lymphoma. *Eur. J. Haematol.* **68**, 217-224 (2002).
 17. Walsh, S. H. & Rosenquist, R. Immunoglobulin gene analysis of mature B-cell malignancies: reconsideration of cellular origin and potential antigen involvement in pathogenesis. *Med. Oncol.* **22**, 327-341 (2005).
 18. Camacho, F. I. *et al.* Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood* **101**, 4042-4046 (2003).
 19. Kienle, D. *et al.* VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* **102**, 3003-3009 (2003).
 20. Orchard, J. *et al.* A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* **101**, 4975-4981 (2003).
 21. Walsh, S. H. *et al.* Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood* **101**, 4047-4054 (2003).
 22. Rubio-Moscardo, F. *et al.* Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* **105**, 4445-4454 (2005).
 23. Weisenburger, D. D. & Armitage, J. O. Mantle cell lymphoma-- an entity comes of age. *Blood* **87**, 4483-4494 (1996).
 24. Campo, E., Raffeld, M. & Jaffe, E. S. Mantle-cell lymphoma. *Semin. Hematol.* **36**, 115-127 (1999).

25. Lardelli, P., Bookman, M. A., Sundeen, J., Longo, D. L. & Jaffe, E. S. Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation. Morphologic and immunophenotypic spectrum and clinical correlations. *Am. J. Surg. Pathol.* **14**, 752-763 (1990).
26. Majlis, A., Pugh, W. C., Rodriguez, M. A., Benedict, W. F. & Cabanillas, F. Mantle cell lymphoma: correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants. *J. Clin. Oncol.* **15**, 1664-1671 (1997).
27. Tiemann, M. *et al.* Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br. J. Haematol.* **131**, 29-38 (2005).
28. Argatoff, L. H., Connors, J. M., Klasa, R. J., Horsman, D. E. & Gascoyne, R. D. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* **89**, 2067-2078 (1997).
29. Swerdlow, S. H. & Williams, M. E. From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. *Hum. Pathol.* **33**, 7-20 (2002).
30. Mansoor, A., Akbari, M., Auer, I. & Lai, R. Cyclin D1 and t(11;14)-positive B-cell neoplasms resembling marginal zone B-cell lymphoma: a morphological variant of mantle cell lymphoma. *Hum. Pathol.* **38**, 797-802 (2007).
31. Young, K. H. *et al.* Mantle cell lymphoma with plasma cell differentiation. *Am. J. Surg. Pathol.* **30**, 954-961 (2006).
32. Zucca, E. *et al.* Patterns of survival in mantle cell lymphoma. *Ann. Oncol.* **6**, 257-262 (1995).
33. Ott, G. *et al.* Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood* **89**, 1421-1429 (1997).
34. Bernard, M. *et al.* Blastic variant of mantle cell lymphoma: a rare but highly aggressive subtype. *Leukemia* **15**, 1785-1791 (2001).
35. Swerdlow, S. H. *et al.* Centrocytic lymphoma: a distinct clinicopathologic and immunologic entity. A multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse. *Am. J. Pathol.* **113**, 181-197 (1983).
36. Norton, A. J. *et al.* Mantle cell lymphoma: natural history defined in a serially biopsied population over a 20-year period. *Ann. Oncol.* **6**, 249-256 (1995).
37. Arber, D. A., Rappaport, H. & Weiss, L. M. Non-Hodgkin's lymphoproliferative disorders involving the spleen. *Mod. Pathol.* **10**, 18-32 (1997).

38. Piris, M. A. *et al.* A marginal zone pattern may be found in different varieties of non-Hodgkin's lymphoma: the morphology and immunohistology of splenic involvement by B-cell lymphomas simulating splenic marginal zone lymphoma. *Histopathology* **33**, 230-239 (1998).
39. Pittaluga, S. *et al.* "Small" B-cell non-Hodgkin's lymphomas with splenomegaly at presentation are either mantle cell lymphoma or marginal zone cell lymphoma. A study based on histology, cytology, immunohistochemistry, and cytogenetic analysis. *Am. J. Surg. Pathol.* **20**, 211-223 (1996).
40. Mollejo, M. *et al.* Splenic involvement by blastic mantle cell lymphoma (large cell/anaplastic variant) mimicking splenic marginal zone lymphoma. *Am. J. Hematol.* **62**, 242-246 (1999).
41. Swerdlow, S. H., Zukerberg, L. R., Yang, W. I., Harris, N. L. & Williams, M. E. The morphologic spectrum of non-Hodgkin's lymphomas with BCL1/cyclin D1 gene rearrangements. *Am. J. Surg. Pathol.* **20**, 627-640 (1996).
42. Oinonen, R., Franssila, K. & Elonen, E. Spontaneous splenic rupture in two patients with a blastoid variant of mantle cell lymphoma. *Ann. Hematol.* **74**, 33-35 (1997).
43. Lai, R. & Medeiros, L. J. Pathologic diagnosis of mantle cell lymphoma. *Clin. Lymphoma* **1**, 197-206 (2000).
44. Bosch, F. *et al.* Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* **82**, 567-575 (1998).
45. Meusers, P., Hense, J. & Brittinger, G. Mantle cell lymphoma: diagnostic criteria, clinical aspects and therapeutic problems. *Leukemia* **11 Suppl 2**, S60-S64 (1997).
46. Samaha, H. *et al.* Mantle cell lymphoma: a retrospective study of 121 cases. *Leukemia* **12**, 1281-1287 (1998).
47. Weisenburger, D. D. *et al.* Mantle cell lymphoma. A clinicopathologic study of 68 cases from the Nebraska Lymphoma Study Group. *Am. J. Hematol.* **64**, 190-196 (2000).
48. Hiddemann, W. *et al.* Mantle-cell lymphomas have more widespread disease and a slower response to chemotherapy compared with follicle-center lymphomas: results of a prospective comparative analysis of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *J. Clin. Oncol.* **16**, 1922-1930 (1998).
49. CORNES, J. S. Multiple lymphomatous polyposis of the gastrointestinal tract. *Cancer* **14**, 249-257 (1961).

50. Chim, C. S., Shek, T. W., Chung, L. P. & Liang, R. Unusual abdominal tumors: case 3. Multiple lymphomatous polyposis in lymphoma of colon. *J. Clin. Oncol.* **21**, 953-955 (2003).
51. Kodama, T. *et al.* Lymphomatous polyposis of the gastrointestinal tract, including mantle cell lymphoma, follicular lymphoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Histopathology* **47**, 467-478 (2005).
52. LeBrun, D. P., Kamel, O. W., Cleary, M. L., Dorfman, R. F. & Warnke, R. A. Follicular lymphomas of the gastrointestinal tract. Pathologic features in 31 cases and bcl-2 oncogenic protein expression. *Am. J. Pathol.* **140**, 1327-1335 (1992).
53. Moynihan, M. J. *et al.* Lymphomatous polyposis. A neoplasm of either follicular mantle or germinal center cell origin. *Am. J. Surg. Pathol.* **20**, 442-452 (1996).
54. Yatabe, Y. *et al.* Multiple polypoid lesions of primary mucosa-associated lymphoid-tissue lymphoma of colon. *Histopathology* **32**, 116-125 (1998).
55. Salar, A. *et al.* Gastrointestinal involvement in mantle cell lymphoma: a prospective clinic, endoscopic, and pathologic study. *Am. J. Surg. Pathol.* **30**, 1274-1280 (2006).
56. Cohen, P. L., Kurtin, P. J., Donovan, K. A. & Hanson, C. A. Bone marrow and peripheral blood involvement in mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **101**, 302-310 (1998).
57. Pittaluga, S. *et al.* Prognostic significance of bone marrow trephine and peripheral blood smears in 55 patients with mantle cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **21**, 115-125 (1996).
58. Wasman, J., Rosenthal, N. S. & Farhi, D. C. Mantle cell lymphoma. Morphologic findings in bone marrow involvement. *Am. J. Clin. Pathol.* **106**, 196-200 (1996).
59. De Oliveira, M. S., Jaffe, E. S. & Catovsky, D. Leukaemic phase of mantle zone (intermediate) lymphoma: its characterisation in 11 cases. *J. Clin. Pathol.* **42**, 962-972 (1989).
60. Wong, K. F., Chan, J. K., So, J. C. & Yu, P. H. Mantle cell lymphoma in leukemic phase: characterization of its broad cytologic spectrum with emphasis on the importance of distinction from other chronic lymphoproliferative disorders. *Cancer* **86**, 850-857 (1999).
61. Weisenburger, D. D., Nathwani, B. N., Diamond, L. W., Winberg, C. D. & Rappaport, H. Malignant lymphoma, intermediate lymphocytic type: a clinicopathologic study of 42 cases. *Cancer* **48**, 1415-1425 (1981).

62. Matutes, E. *et al.* The leukemic presentation of mantle-cell lymphoma: disease features and prognostic factors in 58 patients. *Leuk. Lymphoma* **45**, 2007-2015 (2004).
63. Liu, Z. *et al.* CD5- mantle cell lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **118**, 216-224 (2002).
64. Wohlschlaeger, C., Lange, K., Merz, H. & Feller, A. C. Aberrant immunophenotypes of mantle cell lymphomas. *Leuk. Lymphoma* **44**, 269-273 (2003).
65. Schlette, E., Fu, K. & Medeiros, L. J. CD23 expression in mantle cell lymphoma: clinicopathologic features of 18 cases. *Am. J. Clin. Pathol.* **120**, 760-766 (2003).
66. Schroers, R. *et al.* Immunophenotypic and genetic characterization of a CD8 positive mantle cell lymphoma in a patient with concomitant Mycosis fungoides. *Eur. J. Haematol.* **75**, 78-84 (2005).
67. Kaleem, Z., White, G. & Zutter, M. M. Aberrant expression of T-cell-associated antigens on B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Am. J. Clin. Pathol.* **115**, 396-403 (2001).
68. Fu, K. *et al.* Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* **106**, 4315-4321 (2005).
69. Rosenwald, A. *et al.* The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* **3**, 185-197 (2003).
70. Quintanilla-Martinez, L. *et al.* Mantle cell lymphomas lack expression of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Am. J. Pathol.* **153**, 175-182 (1998).
71. Sanchez-Beato, M. *et al.* Cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 in lymphoid tissue: p27KIP1 expression is inversely proportional to the proliferative index. *Am. J. Pathol.* **151**, 151-160 (1997).
72. Quintanilla-Martinez, L. *et al.* Sequestration of p27Kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphoma (MCL): implications for pathogenesis. *Blood* **101**, 3181-3187 (2003).
73. Cuneo, A. *et al.* Cytogenetic profile of lymphoma of follicle mantle lineage: correlation with clinicobiologic features. *Blood* **93**, 1372-1380 (1999).
74. Pittaluga, S. *et al.* Mantle cell lymphoma: a clinicopathological study of 55 cases. *Histopathology* **26**, 17-24 (1995).

75. Wlodarska, I., Pittaluga, S., Hagemeijer, A., De Wolf-Peeters, C. & Van Den, B. H. Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica* **84**, 594-599 (1999).
76. Hinds, P. W., Dowdy, S. F., Eaton, E. N., Arnold, A. & Weinberg, R. A. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 709-713 (1994).
77. Lovec, H., Grzeschiczek, A., Kowalski, M. B. & Moroy, T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.* **13**, 3487-3495 (1994).
78. Parry-Jones, N. *et al.* Cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) correlate with clinical features in leukaemic presentation of mantle cell lymphoma, and may influence prognosis: a study of 60 cases by FISH. *Br. J. Haematol.* **137**, 117-124 (2007).
79. Stilgenbauer, S. *et al.* Expressed sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Oncogene* **16**, 1891-1897 (1998).
80. Cuneo, A. *et al.* 13q14 deletion in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinicopathologic features. *Haematologica* **84**, 589-593 (1999).
81. Greiner, T. C. *et al.* p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* **87**, 4302-4310 (1996).
82. Louie, D. C. *et al.* p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32). *Blood* **86**, 2892-2899 (1995).
83. Monni, O. *et al.* Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes. Cancer* **21**, 298-307 (1998).
84. Stilgenbauer, S. *et al.* Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. *Blood* **94**, 3262-3264 (1999).
85. Monni, O. *et al.* Molecular characterization of deletion at 11q22.1-23.3 in mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **104**, 665-671 (1999).
86. Camacho, E. *et al.* ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* **99**, 238-244 (2002).

87. Fang, N. Y. *et al.* Oligonucleotide microarrays demonstrate the highest frequency of ATM mutations in the mantle cell subtype of lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 5372-5377 (2003).
88. Greiner, T. C. *et al.* Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 2352-2357 (2006).
89. Allen, J. E. *et al.* Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br. J. Haematol.* **116**, 291-298 (2002).
90. Bea, S. *et al.* Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* **93**, 4365-4374 (1999).
91. Bentz, M. *et al.* t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes. Cancer* **27**, 285-294 (2000).
92. Martinez-Climent, J. A. *et al.* Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* **98**, 3479-3482 (2001).
93. Kohlhammer, H. *et al.* Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* **104**, 795-801 (2004).
94. Tagawa, H. *et al.* Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* **24**, 1348-1358 (2005).
95. Schraders, M. *et al.* Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood* **105**, 1686-1693 (2005).
96. Fernandez, V., Hartmann, E., Ott, G., Campo, E. & Rosenwald, A. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J. Clin. Oncol.* **23**, 6364-6369 (2005).
97. Jares, P., Colomer, D. & Campo, E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 750-762 (2007).

98. Hernandez, L. *et al.* CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res.* **65**, 2199-2206 (2005).
99. Nasmyth, K. A prize for proliferation. *Cell* **107**, 689-701 (2001).
100. McIntosh, J. R. & Koonce, M. P. Mitosis. *Science* **246**, 622-628 (1989).
101. Laskey, R. A., Fairman, M. P. & Blow, J. J. S phase of the cell cycle. *Science* **246**, 609-614 (1989).
102. Pardee, A. B. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603-608 (1989).
103. Matsushime, H. *et al.* D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **14**, 2066-2076 (1994).
104. Pines, J. Protein kinases and cell cycle control. *Semin. Cell Biol.* **5**, 399-408 (1994).
105. Sherr, C. J. Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**, 1059-1065 (1993).
106. Ando, K., Ajchenbaum-Cymbalista, F. & Griffin, J. D. Regulation of G1/S transition by cyclins D2 and D3 in hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 9571-9575 (1993).
107. Pines, J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 195-197 (1993).
108. Pines, J. The cell cycle kinases. *Semin. Cancer Biol.* **5**, 305-313 (1994).
109. DeCaprio, J. A., Furukawa, Y., Ajchenbaum, F., Griffin, J. D. & Livingston, D. M. The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 1795-1798 (1992).
110. Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E. & Sherr, C. J. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* **7**, 331-342 (1993).
111. Nevins, J. R. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**, 424-429 (1992).
112. Dowdy, S. F. *et al.* Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* **73**, 499-511 (1993).

113. Ekholm, S. V. & Reed, S. I. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 676-684 (2000).
114. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816 (1993).
115. Xiong, Y. *et al.* p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-704 (1993).
116. Koff, A. & Polyak, K. p27KIP1, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Prog. Cell Cycle Res.* **1**, 141-147 (1995).
117. Matsuoka, S. *et al.* p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* **9**, 650-662 (1995).
118. Hall, M., Bates, S. & Peters, G. Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. *Oncogene* **11**, 1581-1588 (1995).
119. Peters, G. *et al.* Regulation and function of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16CDKN2. *Leukemia* **11 Suppl 3**, 352-355 (1997).
120. Hannon, G. J. & Beach, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**, 257-261 (1994).
121. Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A. & Massague, J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* **9**, 1831-1845 (1995).
122. Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J. Y., Ashmun, R. A. & Sherr, C. J. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2672-2681 (1995).
123. Sherr, C. J. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 731-737 (2001).
124. Arnold, A. *et al.* Molecular cloning and chromosomal mapping of DNA rearranged with the parathyroid hormone gene in a parathyroid adenoma. *J. Clin. Invest* **83**, 2034-2040 (1989).
125. Rosenberg, C. L. *et al.* PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 9638-9642 (1991).

126. Rimokh, R. *et al.* Rearrangement of CCND1 (BCL1/PRAD1) 3' untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukemias. *Blood* **83**, 3689-3696 (1994).
127. Bosch, F. *et al.* PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* **84**, 2726-2732 (1994).
128. Wiestner, A. *et al.* Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood* **109**, 4599-4606 (2007).
129. Hunter, T. & Pines, J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* **79**, 573-582 (1994).
130. Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677 (1996).
131. Sherr, C. J. & McCormick, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 103-112 (2002).
132. Suzuki, R. *et al.* Selective usage of D-type cyclins in lymphoid malignancies. *Leukemia* **13**, 1335-1342 (1999).
133. Teramoto, N. *et al.* Expression of cyclin D2 and D3 in lymphoid lesions. *Int. J. Cancer* **81**, 543-550 (1999).
134. Delmer, A. *et al.* Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. *Blood* **85**, 2870-2876 (1995).
135. Ott, M. M. *et al.* Cyclin D1 expression in mantle cell lymphoma is accompanied by downregulation of cyclin D3 and is not related to the proliferative activity. *Blood* **90**, 3154-3159 (1997).
136. Yatabe, Y. *et al.* Clinicopathologic study of PRAD1/cyclin D1 overexpressing lymphoma with special reference to mantle cell lymphoma. A distinct molecular pathologic entity. *Am. J. Surg. Pathol.* **20**, 1110-1122 (1996).
137. Yatabe, Y. *et al.* Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* **95**, 2253-2261 (2000).
138. Gesk, S. *et al.* A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* **108**, 1109-1110 (2006).
139. Dreyling, M. H. *et al.* Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* **57**, 4608-4614 (1997).

140. Gronbaek, K. *et al.* Concurrent disruption of cell cycle associated genes in mantle cell lymphoma: a genotypic and phenotypic study of cyclin D1, p16, p15, p53 and pRb. *Leukemia* **12**, 1266-1271 (1998).
141. Pinyol, M. *et al.* Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* **89**, 272-280 (1997).
142. Pinyol, M. *et al.* p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* **91**, 2977-2984 (1998).
143. Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704-707 (1993).
144. Pomerantz, J. *et al.* The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-723 (1998).
145. Chin, L., Pomerantz, J. & DePinho, R. A. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 291-296 (1998).
146. Pinyol, M. *et al.* INK4a/ARF locus alterations in human non-Hodgkin's lymphomas mainly occur in tumors with wild-type p53 gene. *Am. J. Pathol.* **156**, 1987-1996 (2000).
147. Bea, S. *et al.* BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res.* **61**, 2409-2412 (2001).
148. Jacobs, J. J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R. A. & van, L. M. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* **397**, 164-168 (1999).
149. Planas-Silva, M. D. & Weinberg, R. A. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 768-772 (1997).
150. Weinberg, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330 (1995).
151. Efeyan, A. & Serrano, M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* **6**, 1006-1010 (2007).
152. Osborn, A. J., Elledge, S. J. & Zou, L. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol.* **12**, 509-516 (2002).

153. Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M. & Bertrand, R. DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J. Zhejiang. Univ Sci. B* **8**, 377-397 (2007).
154. Lavin, M. F. & Gueven, N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death. Differ.* **13**, 941-950 (2006).
155. Wu, L. & Levine, A. J. Differential regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 genes after high-dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene. *Mol. Med.* **3**, 441-451 (1997).
156. Schaffner, C., Idler, I., Stilgenbauer, S., Dohner, H. & Lichter, P. Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 2773-2778 (2000).
157. Kastan, M. B. *et al.* A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**, 587-597 (1992).
158. Perkins, E. J. *et al.* Sensing of intermediates in V(D)J recombination by ATM. *Genes Dev.* **16**, 159-164 (2002).
159. Zhou, B. B. & Elledge, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439 (2000).
160. Hangaishi, A. *et al.* Mutations of Chk2 in primary hematopoietic neoplasms. *Blood* **99**, 3075-3077 (2002).
161. Tort, F. *et al.* CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **100**, 4602-4608 (2002).
162. Tort, F. *et al.* Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms. *Leukemia* **19**, 112-117 (2005).
163. Prives, C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* **95**, 5-8 (1998).
164. Hernandez, L. *et al.* p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* **87**, 3351-3359 (1996).
165. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257 (1972).

166. Shaham, S. & Horvitz, H. R. Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes Dev.* **10**, 578-591 (1996).
167. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-652 (1993).
168. Hengartner, M. O. & Horvitz, H. R. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* **76**, 665-676 (1994).
169. Nunez, G., Benedict, M. A., Hu, Y. & Inohara, N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**, 3237-3245 (1998).
170. Nicholson, D. W. & Thornberry, N. A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 299-306 (1997).
171. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776 (2000).
172. Rodriguez, J. & Lazebnik, Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* **13**, 3179-3184 (1999).
173. Clem, R. J. Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death. Differ.* **8**, 137-143 (2001).
174. Roy, N. *et al.* The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* **80**, 167-178 (1995).
175. Liston, P. *et al.* Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* **379**, 349-353 (1996).
176. Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M. & Goeddel, D. V. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**, 1243-1252 (1995).
177. Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-304 (1997).
178. Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* **16**, 6914-6925 (1997).
179. Hunter, A. M., LaCasse, E. C. & Korneluk, R. G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis.* **12**, 1543-1568 (2007).

180. Takahashi, R. *et al.* A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J. Biol. Chem.* **273**, 7787-7790 (1998).
181. Richter, B. W. *et al.* Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Mol. Cell Biol.* **21**, 4292-4301 (2001).
182. Shin, S. *et al.* An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* **40**, 1117-1123 (2001).
183. Kasof, G. M. & Gomes, B. C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J. Biol. Chem.* **276**, 3238-3246 (2001).
184. Pickart, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 503-533 (2001).
185. Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M. & Ashwell, J. D. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* **288**, 874-877 (2000).
186. Huang, H. *et al.* The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J. Biol. Chem.* **275**, 26661-26664 (2000).
187. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42 (2000).
188. Verhagen, A. M. *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53 (2000).
189. Liston, P., Fong, W. G. & Korneluk, R. G. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* **22**, 8568-8580 (2003).
190. Weber, C. H. & Vincenz, C. The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem. Sci.* **26**, 475-481 (2001).
191. Growney, J. D. & Dietrich, W. F. High-resolution genetic and physical map of the Lgn1 interval in C57BL/6J implicates Naip2 or Naip5 in Legionella pneumophila pathogenesis. *Genome Res.* **10**, 1158-1171 (2000).
192. Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* **3**, 917-921 (1997).
193. Li, F. *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* **396**, 580-584 (1998).

194. Banks, D. P. *et al.* Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood* **96**, 4002-4003 (2000).
195. Clem, R. J. *et al.* c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment. *J. Biol. Chem.* **276**, 7602-7608 (2001).
196. Deveraux, Q. L. *et al.* Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* **18**, 5242-5251 (1999).
197. Deveraux, Q. L., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. Endogenous inhibitors of caspases. *J. Clin. Immunol.* **19**, 388-398 (1999).
198. Liston, P. *et al.* Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat. Cell Biol.* **3**, 128-133 (2001).
199. Fong, W. G. *et al.* Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* **70**, 113-122 (2000).
200. Liu, Z. *et al.* Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* **408**, 1004-1008 (2000).
201. Hegde, R. *et al.* Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J. Biol. Chem.* **277**, 432-438 (2002).
202. Suzuki, Y. *et al.* A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* **8**, 613-621 (2001).
203. Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H. & Peter, M. E. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**, 1541-1548 (1999).
204. Irmeler, M. *et al.* Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-195 (1997).
205. Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501 (2001).
206. Krammer, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795 (2000).
207. Newmeyer, D. D. & Ferguson-Miller, S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* **112**, 481-490 (2003).
208. Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219 (2004).

209. Cory, S. & Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 647-656 (2002).
210. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324-1337 (2007).
211. Moldoveanu, T. *et al.* The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol. Cell* **24**, 677-688 (2006).
212. Suzuki, M., Youle, R. J. & Tjandra, N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**, 645-654 (2000).
213. Huang, D. C. & Strasser, A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**, 839-842 (2000).
214. Willis, S. N. & Adams, J. M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 617-625 (2005).
215. Wei, M. C. *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-730 (2001).
216. Green, D. R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**, 671-674 (2005).
217. Nijhawan, D. *et al.* Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* **17**, 1475-1486 (2003).
218. Chen, L. *et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* **17**, 393-403 (2005).
219. Willis, S. N. *et al.* Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* **19**, 1294-1305 (2005).
220. Willis, S. N. *et al.* Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**, 856-859 (2007).
221. Cartron, P. F. *et al.* The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol. Cell* **16**, 807-818 (2004).
222. Letai, A. *et al.* Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**, 183-192 (2002).

223. Strasser, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 189-200 (2005).
224. Bouillet, P. *et al.* BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* **415**, 922-926 (2002).
225. Bouillet, P. *et al.* Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* **286**, 1735-1738 (1999).
226. Danial, N. N. *et al.* BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* **424**, 952-956 (2003).
227. Ranger, A. M. *et al.* Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 9324-9329 (2003).
228. Puthalakath, H. *et al.* Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**, 1829-1832 (2001).
229. Han, J. *et al.* Expression of *bbc3*, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 11318-11323 (2001).
230. Oda, E. *et al.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053-1058 (2000).
231. Villunger, A. *et al.* p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**, 1036-1038 (2003).
232. Qin, J. Z. *et al.* Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res.* **65**, 6282-6293 (2005).
233. Perez-Galan, P. *et al.* The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* **107**, 257-264 (2006).
234. Yamaguchi, H. & Wang, H. G. Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome C release independent of interacting with Bax or BimEL. *J. Biol. Chem.* **277**, 41604-41612 (2002).
235. Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C. & Korsmeyer, S. J. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* **290**, 1761-1765 (2000).
236. Lutter, M. *et al.* Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* **2**, 754-761 (2000).

237. Kuwana, T. *et al.* Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**, 331-342 (2002).
238. Kuwana, T. *et al.* BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell* **17**, 525-535 (2005).
239. Walensky, L. D. *et al.* A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Mol. Cell* **24**, 199-210 (2006).
240. Wei, M. C. *et al.* tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* **14**, 2060-2071 (2000).
241. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S. J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619-628 (1996).
242. Verma, S., Zhao, L. J. & Chinnadurai, G. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 4671-4676 (2001).
243. Desagher, S. *et al.* Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol. Cell* **8**, 601-611 (2001).
244. Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M. & Strasser, A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* **3**, 287-296 (1999).
245. Putcha, G. V. *et al.* JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* **38**, 899-914 (2003).
246. Luciano, F. *et al.* Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* **22**, 6785-6793 (2003).
247. Cory, S., Huang, D. C. & Adams, J. M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **22**, 8590-8607 (2003).
248. Kamada, S. *et al.* bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. *Cancer Res.* **55**, 354-359 (1995).
249. Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* **75**, 229-240 (1993).

250. Motoyama, N. *et al.* Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* **267**, 1506-1510 (1995).
251. Motoyama, N., Kimura, T., Takahashi, T., Watanabe, T. & Nakano, T. bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J. Exp. Med.* **189**, 1691-1698 (1999).
252. Print, C. G. *et al.* Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 12424-12431 (1998).
253. Hamasaki, A. *et al.* Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J. Exp. Med.* **188**, 1985-1992 (1998).
254. Rinkenberger, J. L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K. & Korsmeyer, S. J. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev.* **14**, 23-27 (2000).
255. Opferman, J. T. *et al.* Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* **426**, 671-676 (2003).
256. Opferman, J. T. *et al.* Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* **307**, 1101-1104 (2005).
257. Dzhagalov, I., St, J. A. & He, Y. W. The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood* **109**, 1620-1626 (2007).
258. Cimmino, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 13944-13949 (2005).
259. Deng, X., Gao, F., Flagg, T. & May, W. S., Jr. Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 153-158 (2004).
260. McDonnell, T. J. *et al.* bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**, 79-88 (1989).
261. Martinou, J. C. *et al.* Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* **13**, 1017-1030 (1994).
262. Cheng, E. H. *et al.* BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* **8**, 705-711 (2001).

263. Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R. & Thompson, C. B. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* **15**, 1481-1486 (2001).
264. Adams, J. M. & Cory, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr. Opin. Immunol.* (2007).
265. Lindsten, T. *et al.* The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* **6**, 1389-1399 (2000).
266. Rathmell, J. C., Lindsten, T., Zong, W. X., Cinalli, R. M. & Thompson, C. B. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat. Immunol.* **3**, 932-939 (2002).
267. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157 (1996).
268. Joza, N. *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-554 (2001).
269. Klein, J. A. *et al.* The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* **419**, 367-374 (2002).
270. Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99 (2001).
271. Vander Heiden, M. G. *et al.* Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 4666-4671 (2000).
272. Reed, J. C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **387**, 773-776 (1997).
273. Loeffler, M. & Kroemer, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp. Cell Res.* **256**, 19-26 (2000).
274. Muchmore, S. W. *et al.* X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335-341 (1996).
275. Roucou, X., Montessuit, S., Antonsson, B. & Martinou, J. C. Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem. J.* **368**, 915-921 (2002).
276. McDonnell, T. J. & Korsmeyer, S. J. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* **349**, 254-256 (1991).

277. Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L. & Cory, S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* **348**, 331-333 (1990).
278. Liu, Y., Hernandez, A. M., Shibata, D. & Cortopassi, G. A. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 8910-8914 (1994).
279. Zelenetz, A. D., Chen, T. T. & Levy, R. Clonal expansion in follicular lymphoma occurs subsequent to antigenic selection. *J. Exp. Med.* **176**, 1137-1148 (1992).
280. Yano, T., Jaffe, E. S., Longo, D. L. & Raffeld, M. MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood* **80**, 758-767 (1992).
281. Strasser, A., Elefanty, A. G., Harris, A. W. & Cory, S. Progenitor tumours from Emu-bcl-2-myc transgenic mice have lymphomyeloid differentiation potential and reveal developmental differences in cell survival. *EMBO J.* **15**, 3823-3834 (1996).
282. Jager, R., Herzer, U., Schenkel, J. & Weiher, H. Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene* **15**, 1787-1795 (1997).
283. Naik, P., Karrim, J. & Hanahan, D. The rise and fall of apoptosis during multistage tumorigenesis: down-modulation contributes to tumor progression from angiogenic progenitors. *Genes Dev.* **10**, 2105-2116 (1996).
284. Pelengaris, S., Khan, M. & Evan, G. I. Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* **109**, 321-334 (2002).
285. Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C. & Cleveland, J. L. Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* **6**, 1915-1922 (1991).
286. Bissonnette, R. P., Echeverri, F., Mahboubi, A. & Green, D. R. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* **359**, 552-554 (1992).
287. Cory, S., Vaux, D. L., Strasser, A., Harris, A. W. & Adams, J. M. Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res.* **59**, 1685s-1692s (1999).
288. Evan, G. & Littlewood, T. A matter of life and cell death. *Science* **281**, 1317-1322 (1998).

289. Green, D. R. & Evan, G. I. A matter of life and death. *Cancer Cell* **1**, 19-30 (2002).
290. Grumont, R. J., Rourke, I. J. & Gerondakis, S. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 400-411 (1999).
291. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
292. Bouillet, P. *et al.* Gene structure alternative splicing, and chromosomal localization of pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *Mamm. Genome* **12**, 163-168 (2001).
293. Egle, A., Harris, A. W., Bouillet, P. & Cory, S. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 6164-6169 (2004).
294. Zinkel, S. S. *et al.* Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev.* **17**, 229-239 (2003).
295. Packham, G. *et al.* Selective regulation of Bcl-XL by a Jak kinase-dependent pathway is bypassed in murine hematopoietic malignancies. *Genes Dev.* **12**, 2475-2487 (1998).
296. Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Zhang, L. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 1931-1936 (2003).
297. Shibue, T. *et al.* Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev.* **17**, 2233-2238 (2003).
298. Kondo, S. *et al.* Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res.* **60**, 4328-4330 (2000).
299. Rampino, N. *et al.* Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275**, 967-969 (1997).
300. Meijerink, J. P. *et al.* Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* **91**, 2991-2997 (1998).
301. Hermann, M., Scholman, H. J., Marafioti, T., Stein, H. & Schriever, F. Differential expression of apoptosis, Bcl-x and c-Myc in normal and malignant lymphoid tissues. *Eur. J. Haematol.* **59**, 20-30 (1997).
302. Clodi, K. *et al.* Unbalanced expression of Fas and CD40 in mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **103**, 217-219 (1998).

303. Hofmann, W. K. *et al.* Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood* **98**, 787-794 (2001).
304. Korz, C. *et al.* Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood* **99**, 4554-4561 (2002).
305. Gottardi, D. *et al.* In leukaemic CD5+ B cells the expression of BCL-2 gene family is shifted toward protection from apoptosis. *Br. J. Haematol.* **94**, 612-618 (1996).
306. Rummel, M. J., de, V. S., Hoelzer, D., Koeffler, H. P. & Hofmann, W. K. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **45**, 49-54 (2004).
307. Fujise, K., Zhang, D., Liu, J. & Yeh, E. T. Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **275**, 39458-39465 (2000).
308. Zhou, P. *et al.* MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood* **97**, 3902-3909 (2001).
309. Khoury, J. D. *et al.* Expression of Mcl-1 in mantle cell lymphoma is associated with high-grade morphology, a high proliferative state, and p53 overexpression. *J. Pathol.* **199**, 90-97 (2003).
310. Martinez, A. *et al.* Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am. J. Pathol.* **164**, 501-510 (2004).
311. Mestre-Escorihuela, C. *et al.* Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* **109**, 271-280 (2007).
312. Lee, S. H. *et al.* Somatic mutations of TRAIL-receptor 1 and TRAIL-receptor 2 genes in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* **20**, 399-403 (2001).
313. Fernandez, V. *et al.* Frequent polymorphic changes but not mutations of TRAIL receptors DR4 and DR5 in mantle cell lymphoma and other B-cell lymphoid neoplasms. *Haematologica* **89**, 1322-1331 (2004).
314. MacFarlane, M. *et al.* Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene* **21**, 6809-6818 (2002).

315. Rubio-Moscardo, F. *et al.* Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* **106**, 3214-3222 (2005).
316. Roue, G. *et al.* Selective inhibition of I κ B kinase sensitizes mantle cell lymphoma B cells to TRAIL by decreasing cellular FLIP level. *J. Immunol.* **178**, 1923-1930 (2007).
317. Velders, G. A. *et al.* Mantle-cell lymphoma: a population-based clinical study. *J. Clin. Oncol.* **14**, 1269-1274 (1996).
318. Romaguera, J. E. *et al.* Frequency of gastrointestinal involvement and its clinical significance in mantle cell lymphoma. *Cancer* **97**, 586-591 (2003).
319. Jaffe, E. S. Lymphoid lesions of the head and neck: a model of lymphocyte homing and lymphomagenesis. *Mod. Pathol.* **15**, 255-263 (2002).
320. Motegi, S., Okada, E., Nagai, Y., Tamura, A. & Ishikawa, O. Skin manifestation of mantle cell lymphoma. *Eur. J. Dermatol.* **16**, 435-438 (2006).
321. Sen, F. *et al.* Mantle cell lymphoma involving skin: cutaneous lesions may be the first manifestation of disease and tumors often have blastoid cytologic features. *Am. J. Surg. Pathol.* **26**, 1312-1318 (2002).
322. Kakkar, N., Vasishta, R. K., Sharma, Y. & Bhasin, D. K. Intracavitary metastatic non-Hodgkin's lymphoma simulating an atrial myxoma. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **46**, 60-62 (2003).
323. Boullanger, N. *et al.* [Palpable mantle cell lymphoma in the breast]. *Presse Med.* **30**, 163-165 (2001).
324. Fadare, O. & Shukla, P. Another case of mantle cell lymphoma presenting as breast masses. *J. Clin. Pathol.* **55**, 640 (2002).
325. Windrum, P. *et al.* Mantle cell lymphoma presenting as a breast mass. *J. Clin. Pathol.* **54**, 883-886 (2001).
326. Ferry, J. A. *et al.* Lymphoma of the ocular adnexa: A study of 353 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **31**, 170-184 (2007).
327. Fisher, R. I. Mantle cell lymphoma: at last, some hope for successful innovative treatment strategies. *J. Clin. Oncol.* **23**, 657-658 (2005).
328. Goy, A. Mantle cell lymphoma: evolving novel options. *Curr. Oncol. Rep.* **9**, 391-398 (2007).

329. Lenz, G., Dreyling, M. & Hiddemann, W. Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions. *Ann. Hematol.* **83**, 71-77 (2004).
330. Williams, M. E. & Densmore, J. J. Biology and therapy of mantle cell lymphoma. *Curr. Opin. Oncol.* **17**, 425-431 (2005).
331. Witzig, T. E. Current treatment approaches for mantle-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 6409-6414 (2005).
332. Meusers, P. *et al.* Multicentre randomized therapeutic trial for advanced centrocytic lymphoma: anthracycline does not improve the prognosis. *Hematol. Oncol.* **7**, 365-380 (1989).
333. Coiffier, B. *et al.* Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood* **92**, 1927-1932 (1998).
334. Foran, J. M. *et al.* European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **18**, 317-324 (2000).
335. Ghilmini, M. *et al.* Effect of single-agent rituximab given at the standard schedule or as prolonged treatment in patients with mantle cell lymphoma: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *J. Clin. Oncol.* **23**, 705-711 (2005).
336. Howard, O. M. *et al.* Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1288-1294 (2002).
337. Lenz, G. *et al.* Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J. Clin. Oncol.* **23**, 1984-1992 (2005).
338. Lefrere, F. *et al.* Sequential chemotherapy by CHOP and DHAP regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation induces a high rate of complete response and improves event-free survival in mantle cell lymphoma: a prospective study. *Leukemia* **16**, 587-593 (2002).
339. Romaguera, J. E. *et al.* High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *J. Clin. Oncol.* **23**, 7013-7023 (2005).

340. Romaguera, J. E. *et al.* Untreated aggressive mantle cell lymphoma: results with intensive chemotherapy without stem cell transplant in elderly patients. *Leuk. Lymphoma* **39**, 77-85 (2000).
341. Forstpointner, R. *et al.* The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* **104**, 3064-3071 (2004).
342. Decaudin, D. *et al.* Phase II trial of fludarabine monophosphate in patients with mantle-cell lymphomas. *J. Clin. Oncol.* **16**, 579-583 (1998).
343. Foran, J. M. *et al.* Multicenter phase II study of fludarabine phosphate for patients with newly diagnosed lymphoplasmacytoid lymphoma, Waldenstrom's macroglobulinemia, and mantle-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **17**, 546-553 (1999).
344. Cohen, B. J. *et al.* Cyclophosphamide/fludarabine (CF) is active in the treatment of mantle cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **42**, 1015-1022 (2001).
345. Rummel, M. J. *et al.* Treatment of mantle-cell lymphomas with intermittent two-hour infusion of cladribine as first-line therapy or in first relapse. *Ann. Oncol.* **10**, 115-117 (1999).
346. Rummel, M. J. *et al.* Reduced-dose cladribine (2-CdA) plus mitoxantrone is effective in the treatment of mantle-cell and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Cancer* **38**, 1739-1746 (2002).
347. Witzig, T. E. *et al.* Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **17**, 3793-3803 (1999).
348. Witzig, T. E. *et al.* Long-term responses in patients with recurring or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma treated with yttrium 90 ibritumomab tiuxetan. *Cancer* **109**, 1804-1810 (2007).
349. Kasamon, Y. L. Blood or marrow transplantation for mantle cell lymphoma. *Curr. Opin. Oncol.* **19**, 128-135 (2007).
350. Andersen, N. S. *et al.* Primary treatment with autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: outcome related to remission pretransplant. *Eur. J. Haematol.* **71**, 73-80 (2003).
351. Dreyling, M. *et al.* Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma:

- results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood* **105**, 2677-2684 (2005).
352. Khouri, I. F. *et al.* Hyper-CVAD and high-dose methotrexate/cytarabine followed by stem-cell transplantation: an active regimen for aggressive mantle-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **16**, 3803-3809 (1998).
353. Lefrere, F. *et al.* Sequential chemotherapy regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: an update of a prospective study. *Haematologica* **89**, 1275-1276 (2004).
354. Mangel, J. *et al.* Intensive chemotherapy and autologous stem-cell transplantation plus rituximab is superior to conventional chemotherapy for newly diagnosed advanced stage mantle-cell lymphoma: a matched pair analysis. *Ann. Oncol.* **15**, 283-290 (2004).
355. Stewart, D. A. *et al.* The role of high-dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for mantle cell lymphoma. *Ann. Oncol.* **6**, 263-266 (1995).
356. Vandenberghe, E. *et al.* Outcome of autologous transplantation for mantle cell lymphoma: a study by the European Blood and Bone Marrow Transplant and Autologous Blood and Marrow Transplant Registries. *Br. J. Haematol.* **120**, 793-800 (2003).
357. Khouri, I. F. *et al.* Allogeneic hematopoietic transplantation for mantle-cell lymphoma: molecular remissions and evidence of graft-versus-malignancy. *Ann. Oncol.* **10**, 1293-1299 (1999).
358. Kroger, N. *et al.* Allogeneic bone marrow transplantation for refractory mantle cell lymphoma. *Ann. Hematol.* **79**, 578-580 (2000).
359. Martinez, C. *et al.* Patients with mantle-cell lymphoma relapsing after autologous stem cell transplantation may be rescued by allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **26**, 677-679 (2000).
360. Ganti, A. K. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. *Ann. Oncol.* **16**, 618-624 (2005).
361. Kasamon, Y. L. *et al.* Outcomes of autologous and allogeneic blood or marrow transplantation for mantle cell lymphoma. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **11**, 39-46 (2005).
362. Khouri, I. F., Saliba, R. M., Okoroji, G. J., Acholonu, S. A. & Champlin, R. E. Long-term follow-up of autologous stem cell transplantation in patients with diffuse mantle cell lymphoma in first disease remission: the prognostic value of beta2-microglobulin and the tumor score. *Cancer* **98**, 2630-2635 (2003).

363. Faulkner, R. D. *et al.* BEAM-alemtuzumab reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation for lymphoproliferative diseases: GVHD, toxicity, and survival in 65 patients. *Blood* **103**, 428-434 (2004).
364. Khouri, I. F. *et al.* Nonablative allogeneic stem-cell transplantation for advanced/recurrent mantle-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4407-4412 (2003).
365. Maris, M. B. *et al.* Allogeneic hematopoietic cell transplantation after fludarabine and 2 Gy total body irradiation for relapsed and refractory mantle cell lymphoma. *Blood* **104**, 3535-3542 (2004).
366. Rajkumar, S. V., Richardson, P. G., Hideshima, T. & Anderson, K. C. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 630-639 (2005).
367. Pham, L. V., Tamayo, A. T., Yoshimura, L. C., Lo, P. & Ford, R. J. Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J. Immunol.* **171**, 88-95 (2003).
368. Fisher, R. I. *et al.* Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **24**, 4867-4874 (2006).
369. Goy, A. *et al.* Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 667-675 (2005).
370. Kane, R. C. *et al.* Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **13**, 5291-5294 (2007).
371. O'Connor, O. A. *et al.* Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 676-684 (2005).
372. Wang, M. *et al.* Bortezomib is synergistic with rituximab and cyclophosphamide in inducing apoptosis of mantle cell lymphoma cells in vitro and in vivo. *Leukemia* (2007).
373. Weigert, O. *et al.* Sequence-dependent synergy of the proteasome inhibitor bortezomib and cytarabine in mantle cell lymphoma. *Leukemia* **21**, 524-528 (2007).
374. Damaj, G. *et al.* Thalidomide therapy induces response in relapsed mantle cell lymphoma. *Leukemia* **17**, 1914-1915 (2003).
375. Wilson, E. A., Jobanputra, S., Jackson, R., Parker, A. N. & McQuaker, I. G. Response to thalidomide in chemotherapy-resistant mantle cell lymphoma: a case report. *Br. J. Haematol.* **119**, 128-130 (2002).

376. Kaufmann, H. *et al.* Antitumor activity of rituximab plus thalidomide in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Blood* **104**, 2269-2271 (2004).
377. Dumontet, C. *et al.* Gemcitabine as a single agent in the treatment of relapsed or refractory low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Haematol.* **113**, 772-778 (2001).
378. Morschhauser, F. *et al.* Phase II study of gemcitabine-dexamethasone with or without cisplatin in relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Ann. Oncol.* **18**, 370-375 (2007).
379. Venkataraman, G. *et al.* Induction of apoptosis and down regulation of cell cycle proteins in mantle cell lymphoma by flavopiridol treatment. *Leuk. Res.* **30**, 1377-1384 (2006).
380. Kouroukis, C. T. *et al.* Flavopiridol in untreated or relapsed mantle-cell lymphoma: results of a phase II study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.* **21**, 1740-1745 (2003).
381. Lin, T. S., Howard, O. M., Neuberg, D. S., Kim, H. H. & Shipp, M. A. Seventy-two hour continuous infusion flavopiridol in relapsed and refractory mantle cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **43**, 793-797 (2002).
382. Witzig, T. E. *et al.* Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5347-5356 (2005).
383. Andersen, N. S., Jensen, M. K., de Nully, B. P. & Geisler, C. H. A Danish population-based analysis of 105 mantle cell lymphoma patients: incidences, clinical features, response, survival and prognostic factors. *Eur. J. Cancer* **38**, 401-408 (2002).
384. Oinonen, R., Franssila, K., Teerenhovi, L., Lappalainen, K. & Elonen, E. Mantle cell lymphoma: clinical features, treatment and prognosis of 94 patients. *Eur. J. Cancer* **34**, 329-336 (1998).
385. Hoster, E. *et al.* A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced stage mantle cell lymphoma. *Blood* (2007).
386. Raty, R., Franssila, K., Joensuu, H., Teerenhovi, L. & Elonen, E. Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *Eur. J. Haematol.* **69**, 11-20 (2002).
387. Zoldan, M. C. *et al.* Large-cell variants of mantle cell lymphoma: cytologic characteristics and p53 anomalies may predict poor outcome. *Br. J. Haematol.* **93**, 475-486 (1996).

388. Schrader, C. *et al.* Topoisomerase II α expression in mantle cell lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor for clinical outcome. *Leukemia* **18**, 1200-1206 (2004).
389. Moller, M. B., Pedersen, N. T. & Christensen, B. E. Mantle cell lymphoma: prognostic capacity of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Br. J. Haematol.* **133**, 43-49 (2006).
390. Salaverria, I. *et al.* Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J. Clin. Oncol.* **25**, 1216-1222 (2007).
391. Bellosillo, B., Colomer, D., Pons, G. & Gil, J. Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* **100**, 142-146 (1998).
392. Bailly, J. D. *et al.* Natural resistance of acute myeloid leukemia cell lines to mitoxantrone is associated with lack of apoptosis. *Leukemia* **11**, 1523-1532 (1997).
393. De, I. P., Capranico, G. & Zunino, F. The role of topoisomerase II in drug resistance. *Life Sci.* **48**, 2195-2205 (1991).
394. Reiman, T. *et al.* Mechanisms of resistance to nucleoside analogue chemotherapy in mantle cell lymphoma: a molecular case study. *Leukemia* **16**, 1886-1887 (2002).
395. Marce, S. *et al.* Expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) and its correlation with gemcitabine uptake and cytotoxicity in mantle cell lymphoma. *Haematologica* **91**, 895-902 (2006).
396. Molina-Arcas, M. *et al.* Equilibrative nucleoside transporter-2 (hENT2) protein expression correlates with ex vivo sensitivity to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leukemia* **19**, 64-68 (2005).
397. Bellosillo, B. *et al.* In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 2836-2843 (1999).
398. Bosch, F. *et al.* Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **119**, 976-984 (2002).
399. Bellosillo, B. *et al.* Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100**, 1810-1816 (2002).

400. Chen, R., Keating, M. J., Gandhi, V. & Plunkett, W. Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* **106**, 2513-2519 (2005).
401. de Vries, J. F., Falkenburg, J. H., Willemze, R. & Barge, R. M. The mechanisms of Ara-C-induced apoptosis of resting B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* **91**, 912-919 (2006).
402. Gojo, I., Zhang, B. & Fenton, R. G. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. *Clin. Cancer Res.* **8**, 3527-3538 (2002).
403. Raje, N. *et al.* Seliciclib (CYC202 or R-roscovitine), a small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitor, mediates activity via down-regulation of Mcl-1 in multiple myeloma. *Blood* **106**, 1042-1047 (2005).
404. MacCallum, D. E. *et al.* Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res.* **65**, 5399-5407 (2005).
405. Gomez-Bougie, P., Oliver, L., Le, G. S., Bataille, R. & Amiot, M. Melphalan-induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of Mcl-1 and Bim and a decrease in the Mcl-1/Bim complex. *Oncogene* **24**, 8076-8079 (2005).
406. Gomez-Bougie, P. *et al.* Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res.* **67**, 5418-5424 (2007).
407. Longo, P. G. *et al.* The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Blood* (2007).
408. Hussain, S. R. *et al.* Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2144-2150 (2007).
409. Peponi, E. *et al.* Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* **169**, 2171-2180 (2006).
410. Chow, K. U. *et al.* Synergistic effects of chemotherapeutic drugs in lymphoma cells are associated with down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), prostate-apoptosis-response-gene 4 (Par-4), death-associated protein (Daxx) and with enforced caspase activation. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 711-724 (2003).

411. Rosato, R. R., Dai, Y., Almenara, J. A., Maggio, S. C. & Grant, S. Potent antileukemic interactions between flavopiridol and TRAIL/Apo2L involve flavopiridol-mediated XIAP downregulation. *Leukemia* **18**, 1780-1788 (2004).
412. Kashkar, H. *et al.* NF-kappaB-independent down-regulation of XIAP by bortezomib sensitizes HL B cells against cytotoxic drugs. *Blood* **109**, 3982-3988 (2007).
413. Xue, L. Y., Chiu, S. M. & Oleinick, N. L. Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions. *Exp. Cell Res.* **283**, 135-145 (2003).
414. Fedier, A. *et al.* Loss of atm sensitises p53-deficient cells to topoisomerase poisons and antimetabolites. *Ann. Oncol.* **14**, 938-945 (2003).
415. M'kacher, R. *et al.* Multiple molecular mechanisms contribute to radiation sensitivity in mantle cell lymphoma. *Oncogene* **22**, 7905-7912 (2003).
416. Duggan, M. J. *et al.* Mantle zone lymphoma. A clinicopathologic study of 22 cases. *Cancer* **66**, 522-529 (1990).
417. Vizcarra, E. *et al.* Identification of two subgroups of mantle cell leukemia with distinct clinical and biological features. *Hematol. J.* **2**, 234-241 (2001).
418. Zinzani, P. L. *et al.* Isolated central nervous system relapse in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: the Bologna experience. *Leuk. Lymphoma* **32**, 571-576 (1999).
419. Bashir, R. M., Bierman, P. J., Vose, J. M., Weisenburger, D. D. & Armitage, J. O. Central nervous system involvement in patients with diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Am. J. Clin. Oncol.* **14**, 478-482 (1991).
420. Bishop, P. C. *et al.* CNS involvement in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2479-2485 (1999).
421. Hollender, A. *et al.* Central nervous system involvement following diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma: a risk model. *Ann. Oncol.* **13**, 1099-1107 (2002).
422. Lopez-Guillermo, A. *et al.* Peripheral T-cell lymphomas: initial features, natural history, and prognostic factors in a series of 174 patients diagnosed according to the R.E.A.L. Classification. *Ann. Oncol.* **9**, 849-855 (1998).
423. van Besien, K. *et al.* Risk factors, treatment, and outcome of central nervous system recurrence in adults with intermediate-grade and immunoblastic lymphoma. *Blood* **91**, 1178-1184 (1998).

424. Sandlund, J. T. *et al.* CNS involvement in children with newly diagnosed non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **18**, 3018-3024 (2000).
425. Bedotto, J. *et al.* Mantle zone lymphoma with central nervous system involvement. *Cancer* **58**, 2125-2129 (1986).
426. Ellison, D. J., Turner, R. R., Van, A. R., Martin, S. E. & Nathwani, B. N. High-grade mantle zone lymphoma. *Cancer* **60**, 2717-2720 (1987).
427. Montserrat, E. *et al.* CNS involvement in mantle-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **14**, 941-944 (1996).
428. Feugier, P. *et al.* Incidence and risk factors for central nervous system occurrence in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma: influence of rituximab. *Ann. Oncol.* **15**, 129-133 (2004).
429. Tomita, N., Kodama, F., Kanamori, H., Motomura, S. & Ishigatsubo, Y. Prophylactic intrathecal methotrexate and hydrocortisone reduces central nervous system recurrence and improves survival in aggressive non-hodgkin lymphoma. *Cancer* **95**, 576-580 (2002).
430. Bos, G. M. *et al.* For which patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma is prophylaxis for central nervous system disease mandatory? Dutch HOVON Group. *Ann. Oncol.* **9**, 191-194 (1998).
431. Perez-Soler, R., Smith, T. L. & Cabanillas, F. Central nervous system prophylaxis with combined intravenous and intrathecal methotrexate in diffuse lymphoma of aggressive histologic type. *Cancer* **57**, 971-977 (1986).
432. Tilly, H. *et al.* Intensive conventional chemotherapy (ACVBP regimen) compared with standard CHOP for poor-prognosis aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **102**, 4284-4289 (2003).