

# Activitat *natural killer* a la leucèmia limfàtica crònica de línia B

Neus Villamor i Casas

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



1. Index.....	1
2. Abreviatures.....	3
<b>3. Revisió bibliogràfica</b>	
3.A. Cèl·lules <i>natural killer</i>	
3.A.1. Definició, origen i caracterització.....	5
3.A.2. Funcionalisme, regulació i mecanismes de lisi.....	28
3.A.3. Les cèl·lules <i>natural killer</i> en situacions patològiques.....	46
3.A.4. Mètodes d'estudi de les cèl·lules <i>natural killer</i> i grups cel·lulars relacionats.....	57
3.B. Leucèmia limfàtica crònica de tipus B	
3.B.1. Definició i etiopatogènia.....	59
3.B.2. Aspectes clínics i immunològics.....	63
3.B.3. Factors pronòstics.....	74
3.B.4. Tractament i valoració de la resposta.....	86
3.C. Cèl·lules <i>natural killer</i> a la leucèmia limfàtica crònica B	
3.C.1. Activitat <i>natural killer</i> .....	96
3.C.2. Fenotipus de les cèl·lules <i>natural killer</i> .....	100
3.C.3. Altres aspectes relatius a les cèl·lules <i>natural killer</i> .....	102
4. Objectius.....	105
<b>5. Material i mètodes</b>	
5.A. Pacients i criteris diagnòstics.....	106
5.B. Recompte de limfòcits grans granulats.....	108
5.C. Assaig de citotoxicitat.....	108
5.D. Poblacions limfocitàries.....	114
5.E. Purificació de limfòcits B.....	119
5.F. Mètodes estadístics	
5.F.1. Estratègia del estudi.....	121
5.F.2. Proves estadístiques utilitzades.....	126
5.F.3. <i>Hardware i software</i> .....	130
<b>6. Resultats</b>	
6.A. Estandarització de la tècnica.....	133
6.B. Efecte dels limfòcits B purificats en l'activitat <i>natural killer</i> .....	142
6.C. Sèrie Inicial	
6.C.1. Descripció de la sèrie.....	146
6.C.2. Activitat <i>natural killer</i> i característiques dels pacients.....	160
6.C.3. Poblacions limfocitàries i característiques dels pacients.....	174
6.C.4. Supervivència i factors pronòstics.....	184
6.C.5. Progressió limfocitària i factors pronòstics.....	187
6.C.6. Progressió de la malaltia i factors pronòstics.....	187

6.D. Activitat <i>NK</i> i poblacions limfocitàries en malalts no tractats.....	194
6.E. Activitat <i>natural killer</i> en incubacions prolongades.....	209
6.F. Evolució de l'activitat <i>natural killer</i> amb el temps	
6.F.1. Malalts no tractats.....	216
6.F.2. Malalts sota tractament quimioteràpic.....	217
6.F.3. Malalts sota tractament immunomodulador.....	220
7. Discussió.....	229
8. Conclusions.....	250
9. Bibliografia.....	255

## AGRAÏMENTS

La present tesi doctoral ha pogut ser realitzada gràcies a la participació, col·laboració i ajuda, a nivell científic, humà o laboral, de:

- Prof. C. Rozman, cap de Servei d'Hematologia Clínica.
- Prof. J.L. Vives-Corróns, cap de Servei d'Hematologia Biològica
- Prof. E. Montserrat, director d'aquesta tesi doctoral
- Prof. C. Castillo, cap de Servei d'Hemoteràpia i Hemostàsia
- Dr. J.C. Reverter, adjunt del Servei d'Hemoteràpia i Hemostàsia
- els integrants i ex-integrants del Servei d'Hematologia Biològica
- els integrants i ex-integrants del Servei d'Hematologia Clínica
- els integrants del Servei d'Hemoteràpia i Hemostàsia
- els serveis de Medicina Nuclear i Immunologia de l'Hospital Clínic
- el personal que compona l'equip d'extraccions
- el personal encarregat de l'arxiu d'històries clíniques
- totes aquelles persones que m'han ajudat i no es veuen incloses en els apartats previs.

Aquest estudi ha sigut finançat per:

- l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, a l'atorgar el 1988 una beca d'investigació que ha permès la realització d'aquesta tesi.
- "Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social" a l'adjudicar d'una beca per l'estudi dels efectes de l'alfa interferó a la LLC-B.

News VILLAMOR (ASAS)

LLISTAT D'ABREVIATURES

Ac	Anticós(sos)
AcMo	Anticós(sos) monoclonal(s)
ADN	Acid desoxirribonucleic
Ag	Antigen(s)
AMPc	Adenosin monofosfat cíclic
ANK	Activitat <i>natural killer</i>
ARN <sub>m</sub>	Acid ribonucleic missatger
BCGF	Factor de creixement de cèl·lules B ( <i>B cell growth factor</i> )
BMO	Biòpsia de moll d'os
C3	Proteïna C3 del sistema del complement
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDn <sub>s</sub>	<i>Cluster of differentiation n a nivell membrana</i>
CFM	Ciclofosfamida
CHOP	Ciclofosfamida+Vincristina+Adriamicina+Prednisona
CLB	Clorambucil
CMN	Cel·lularitat mononucleada
CMP	Ciclofosfamida+Melfalan+Prednisona
CMV	Citomegalovirus
CNK	Cèl·lula(es) <i>natural killer</i>
CSF	Factor estimulant de colònies ( <i>Colony stimulating factor</i> )
D:E	Diana:Efectora
FC $\gamma$ R	Receptor Fc per la IgG
GM-CSF	Factor estimulant de colònies granulo-monocítiques
HLA	<i>Human leukocyte antigens</i>
HTLV	<i>Human T leukemia virus</i>
IFN	Interferó
Ig	Immunoglobulina(es)
IL	Interleuquina(es)
LA	Leucèmia aguda
LAK	<i>Lymphoquine activated killer cells</i>
LAL	Leucèmia aguda limfoblàstica
LFA	<i>Leukocyte function associated molecules</i>
LGG	Limfòcit gran granulat
LLC	Leucèmia limfàtica crònica
LSP	Limfòcit(s) de sang perifèrica
MECH	Malaltia de l'empelt contra l'hoste
MO	Medulla òssia
NK	<i>Natural killer</i>
NKCF	Factor citotòxic natural killer ( <i>NK cytotoxic factor</i> )
NKSF	Factor estimulant natural killer ( <i>NK stimulating factor</i> )
PHA	Fitohemaglutinina
PK-C	Proteïna quinasa C
R-IL-2	Receptor de la interleuquina 2
RCT	Receptor de cèl·lules T
RER	Retícul endoplàsmic rugós

SISC	Síndrome d'immunodeficiència severa combinada
SLPC	Síndrome limfoproliferativa crònica
SMH	Sistema major d'histocompatibilitat
SP	Sang perifèrica
TCGF	Factor de creixement de cèl·lules T ( <i>T cell growth factor</i> )
T <sub>ctx</sub>	Limfòcit T citotòxic
TDL	Temps de duplicació limfocitari
TMO	Transplantament de moll d'os
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TPA	<i>Tubular parallel array</i>
VEB	Virus d'Epstein-Barr
VIH	Virus de la immunodeficiència humana

Les cèl·lules *natural killer* (CNK) van ser descobertes a l'inici de la dècada de 1970 mentre es realitzaven estudis de citotoxicitat mitjançada per cèl·lules (1). La troballa d'activitat lítica produïda sense contacte immunològic previ o citotoxicitat "natural" va induir els estudis per la caracterització morfològica i immunològica d'aquesta població cel·lular. Posteriorment l'associació de les cèl·lules amb capacitat per la lisi natural amb una morfologia determinada (limfòcits grans granulats -LGG-), la purificació per característiques físiques diferencials i la determinació d'antígens de superfície específics han permès l'estudi més profund de la funció de les CNK en el sistema immune, la recerca del seu origen lineal i el seu paper en diverses patologies.

Avui en dia, les CNK són considerades diferents dels limfòcits T citotòxics ( $T_{ctx}$ ), ja que no utilitzen determinants del sistema major d'histocompatibilitat (SMH) en el contacte amb la cèl·lula diana ni tenen memòria immune (2). Malgrat l'aparent falta d'especificitat, les CNK estan implicades en un ampli ventall de funcions immunològiques cada dia més ben conegudes. La principal característica d'aquest grup cel·lular és lisar de forma espontània certes cèl·lules diana, bàsicament cèl·lules tumorals i cèl·lules transformades per infeccions virals (2-3). A més, actuen contra diversos microorganismes (fongs, paràsits); tenen una funció immunoreguladora per producció de citoquines (ex: interleuquina 2) i un efecte regulador de l'hemopoesi (2). En conjunt, aquesta població participa en la conservació de la salut dels individus (4).



## ONTOGENIA DE LES CEL·LULES NATURAL KILLER

L'origen de les CNK no està encara plenament **establert**. No s'han identificat, fins el dia d'avui, estructures *natural killer* (NK) específiques codificades per gens que es reordenin en el transcurs de la maduració de la CNK, tal com s'ha demostrat en limfòcits B i T (5-6). Les característiques fenotípiques i funcionals que té la població NK han fet que es proposi un origen mielomonocitari (7-8), de línia limfoide T (9-11), de línia limfoide B (12) i un origen independent (3,13-14).

La relació entre les CNK i la línia mielomonocitària es basa en l'expressió d'antígens monocitaris (CD11b), la presència d'esterases amb inhibició per NaFl, la producció de citoquines generalment sintetitzades per monòcits (IL-1,  $\alpha$ -TNF) i la capacitat dels cultius de promonòcits de produir activitat *natural killer* (ANK) like (15-16). Aquest origen lineal es recolza també en l'existència d'immunodeficiències (Chediak-Higashi) on el defecte està localitzat a nivell dels grànuls lisosòmics de les cèl·lules mieloides, CNK i limfòcits T<sub>ctx</sub> (15).

Alguns treballs relacionen les CNK amb els limfòcits de línia B. L'expressió de petites quantitats d'Ig a la superfície de les cèl·lules, així com de receptors pel C3, troballa típica dels limfòcits B, s'ha trobat en CNK. No obstant, la troballa d'Ig no és un fet constant, i la deplecció de cèl·lules efectores mitjançant Ig i complement no provoca una disminució de l'ANK, fent poc probable l'origen B de les CNK (16).

L'origen lineal T es basa en característiques fenotípiques i funcionals de les CNK. Les CNK expressen els antígens de superfície CD2 i CD8 que estan presents en limfòcits T madurs (11,13,17-18). En canvi, els LGG normals o patològics (que tenen trets d'immaduresa) no expressen cap antigen propi dels limfòcits T immadurs, **excepte el** CD38 (16),

comparteixen amb els limfòcits T estructures per interaccionar amb la cèl·lula diana (antigen leucocitari comú -LFA-1) i la sensibilitat per determinades citoquines, com la IL-2 (2,15,17,19). A nivell genòmic s'ha demostrat reordenament pel receptor de cèl·lules T (RCT), cadenes  $\beta$  i  $\tau$ , tal com s'observa limfòcits T normals en clons cel·lulars obtinguts d'individus sans (20). No obstant, el reordenament es limita a les proliferacions cel·lulars que expressen el CD3, i moltes d'aquestes proliferacions no poseixen ANK (21).

La darrera hipòtesi de diferenciació de les CNK proposa un origen cel·lular independent. Es basa en la presència de característiques fenotípiques, funcionals i genòmiques que li son pròpies, i en dades obtingudes de processos patològics. Les CNK expressen una sèrie d'antígens de superfície molt específics: CD16 i CD56 (18). La purificació de poblacions amb marcadors NK específics mitjançant citometria de flux ha permès realitzar estudis *in vitro* de diferenciació cel·lular. D'aquests estudis es desprèn que el CD16 apareix de forma molt precoç en la diferenciació de la CNK (22).

Els estudis efectuats en el decurs de transplantaments de moll d'os (TMO) han contribuït a la hipòtesi de la línia independent de les CNK. En transplantaments realitzats en animals i humans s'ha demostrat que les CNK són transplantables independentment dels limfòcits T i B (23-24). Altres situacions patològiques corroboren el llinatge independent. Les immunodeficiències humanes tenen uns patrons de dèficit que permeten classificar-les segons el grup cel·lular defectuós, i així hi ha immunodeficiències que afecten els limfòcits T i B sense alterar el funcionalisme de les CNK (25). Els dèficits fins ara coneguts recolzaven l'origen independent o "tercera línia" de les CNK, si bé no s'havia pogut identificar cap immunodeficiència selectiva de CNK. Recentment s'ha descrit un quadre d'immunodeficiència que podria afectar de forma selectiva i aïllada a les CNK (26). Finalment, l'estudi genòmic del RCT a la

població NK normal ha demostrat que els gens de les cadenes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\tau$  i  $\delta$  estan en línia germinal (14,18,27), i no s'ha observat transcripció d'ARN missatger (ARN<sub>m</sub>) per la cadena  $\alpha$  o  $\tau$  ni de l'ARN funcional de la cadena  $\beta$  (18,28).

El 1988 es va restringir el terme CNK a la població que no expressa el CD3 o el RCT (18) i a l'analitzar l'estructura genòmica dels processos patològics humans per proliferació de LGG CD2<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> tampoc s'ha demostrat reordenament en el RCT (14,29). La reordenació dels gens de les cadenes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\tau$  i  $\delta$  del RCT tampoc s'ha pogut demostrar en purificacions de CNK provinents individus normals encara que expressin l'antigen T CD8. La falta de reordenament per la cadena  $\tau$  i  $\delta$  fa molt suggestiva la idea de línia independent, ja que timòcits molt immadurs (CD3<sub>g</sub><sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) tenen el gen de la cadena  $\tau$  reordenada (14). A part d'aquest tret genotípic diferencial amb els limfòcits T, ni el reordenament del RCT ni el complex CD3/Ti són necessaris per l'activitat lítica desenvolupada per les CNK (14-15,18,30-31).

Per tant, les dades actuals semblen recolzar la hipòtesi de la "tercera línia" per l'origen de les CNK. Malgrat la creença que les CNK són una línia cel·lular independent, el nivell a partir del qual es separen de la *stem cell* no es coneix. Per uns autors (25), la CNK s'originaria a l'entrecruament entre la línia mielomonocítica i la limfoide T (figura 3.A.1.1) i per altres la separació es produiria després de l'establiment de la població mielomonocítica i limfoide B, en una línia restringida limfoide T/NK (15) (figura 3.A.1.2). Els partidaris d'aquest nivell de separació tampoc estan d'acord en el teixit anatòmic en el que es produiria la divergència de la línia T i NK. Per (15) la separació es produiria abans d'entrar al timus, mentre que per Garni-Wagner *et al* (32) existiria un precursor comú T/NK al timus.

MOLL D'OS

STEM CELL  
PLURIPOTENT

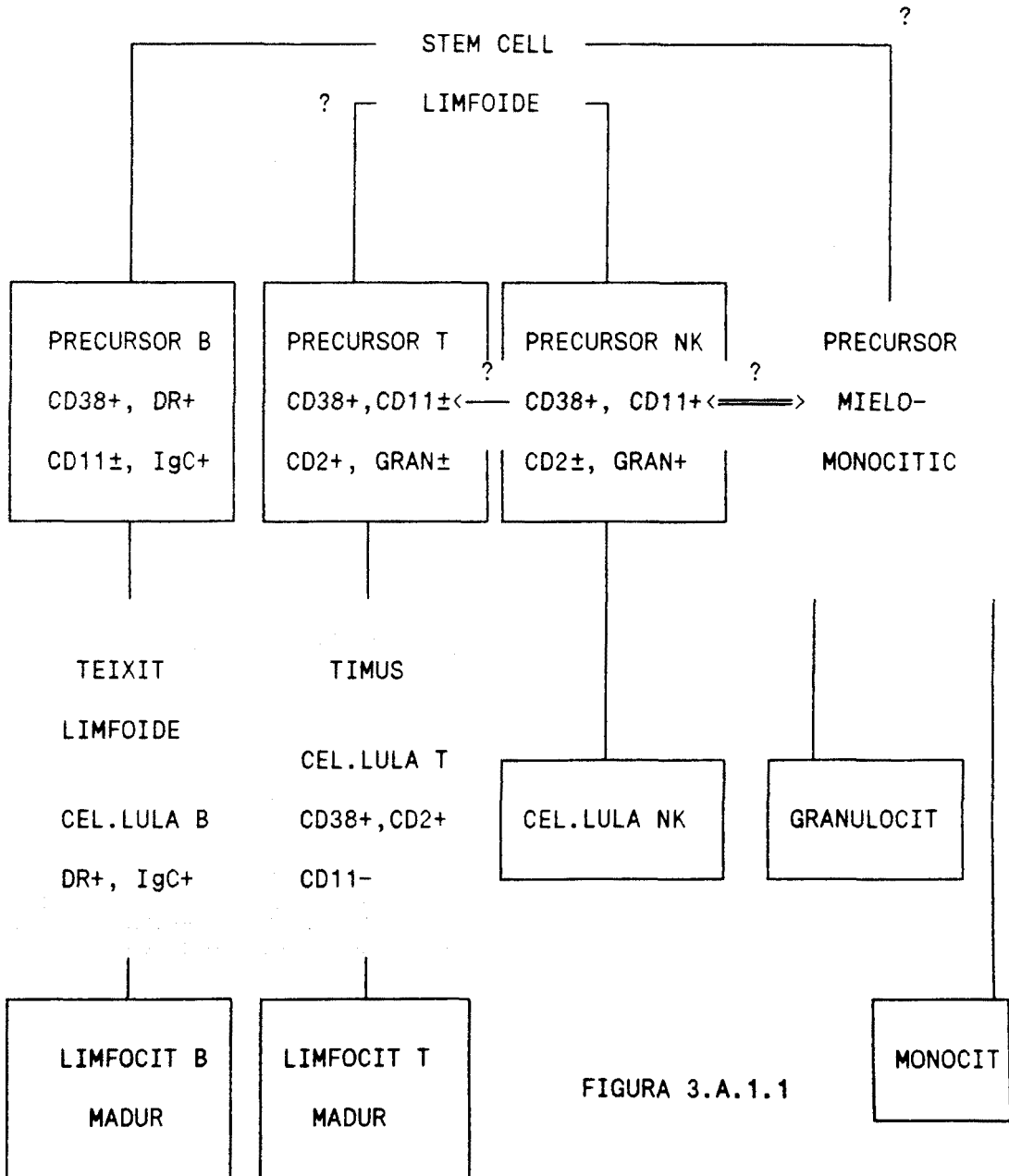
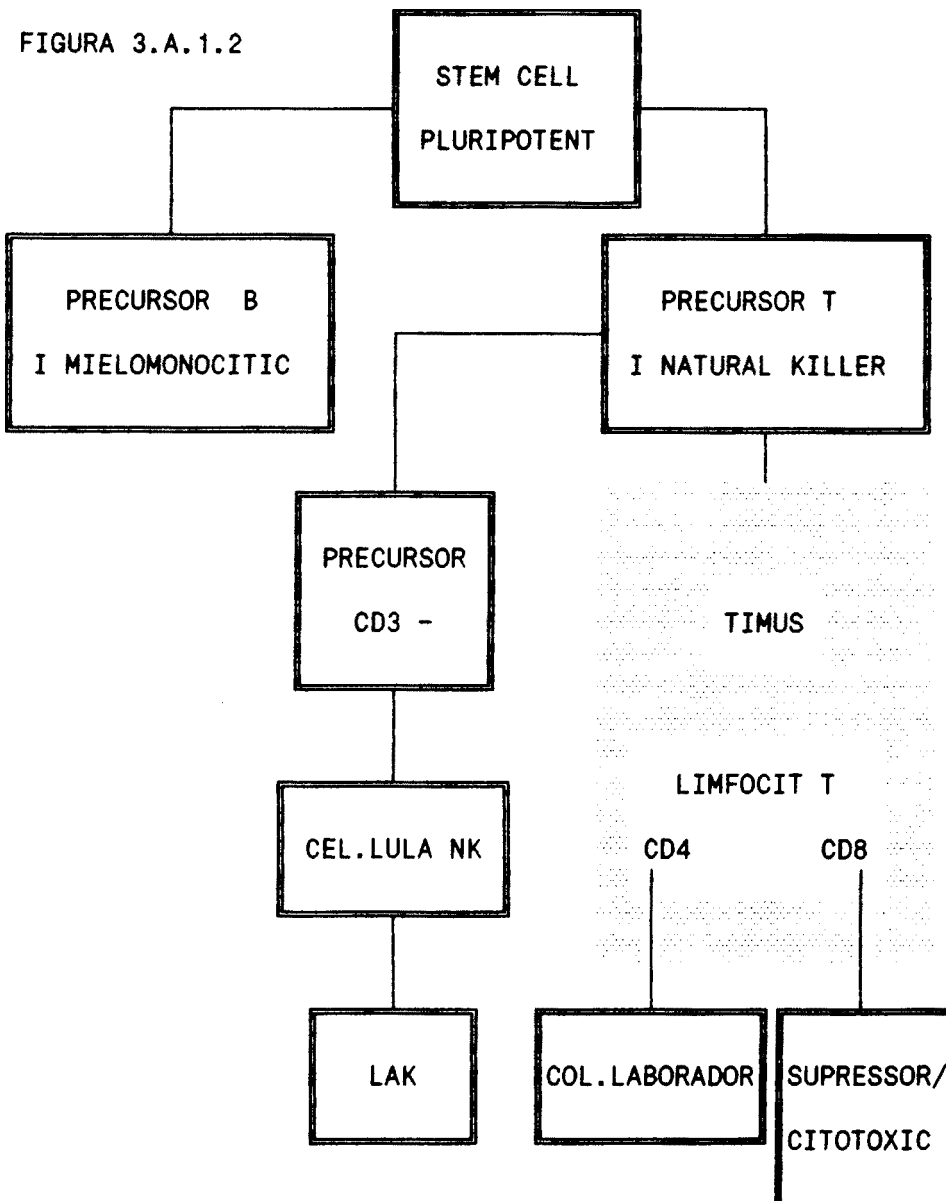


FIGURA 3.A.1.1

Model de diferenciació proposat per HH Peter (25)



Model de diferenciació proposat per Ortaldo et al (15)

## MORFOLOGIA I REACTIVITAT CITOQUÍMICA DE LES CEL·LULES *NATURAL KILLER*.

L'ANK de la sang perifèrica està continguda en la població de limfòcits grans granulats (LGG) (16). Els LGG tenen un diàmetre de 12-15 µm, morfològicament són limfòcits de nucli reniforme, citoplasma abundant amb granulació atzuròfila (figura 3.A.1.3) (13,22,30). Els grànuls que posseeixen varien en nombre i tamany i, per exemple, les dones tenen un nombre de grànuls inferiors al dels homes (33).

Els LGG són fàcilment reconeixibles en extensions de sang perifèrica tenyides amb May-Grünwald-Giemsa (33). Els LGG representen entre el 4% i el 8% de les cèl·lules de la sang perifèrica i el 13% - 26% dels limfòcits (34-35). El nombre absolut de LGG és de  $0.222 \pm 0.046 \times 10^9/L$  (33). Encara que el percentatge de LGG és inferior en les dones respecte dels homes, no existeixen diferències respecte el nombre absolut. En paral·lel amb aquestes dades s'ha descrit que les dones de 17 a 59 anys tenen una proporció i un nombre menor de cèl·lules CD16<sup>+</sup>, així com una menor activitat lítica (36).

Els LGG presenten activitat fosfatasa àcida paranuclear sensible al tartrat (13,16) i β-glucoronidasa a nivell dels grànuls (13). No reaccionen o ho fan molt dèbilment per les esterases inespecífiques alfa-naftil acetat (ANAE) i alfa-butirat esterasa (ANBE) (13,16,37). La reactivitat de les hidrolases és paranuclear amb un patró granular o difús.

A nivell ultrastructural la superfície dels LGG és irregular per la presència de nombrosos *microvilli* de poca longitud (37). El nucli és lleugerament arronyonat i ric en eucromatina presentant de forma ocasional un petit nucleol (38). El citoplasma és abundant, amb escasses mitocondries, nombroses vesícules disperses pel citoplasma, però sobretot prop de la indentadura nuclear, presentant vacúols i petites làmines

d'ergoplasma junt amb un aparell de Golgi desenvolupat (16,37). No s'observen vesícules de fagocitosi (13,16,37-38). Els grànuls són de centre electrodens i amb freqüència s'observen formacions **tubulars** paral·leles (*tubular parallel arrays - TPA*) conjuntament amb els **grànuls** (37) (figura 3.A.1.4). Les TPA poden estar lligades a la **membrana** o lliures al citoplasma i poden contenir substància amorfa en el seu interior (38). Els TPA semblen més nombrosos en els LGG CD57<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (38).

No s'ha observat reactivitat per la mieloperoxidasa ni per la macrofagoperoxidasa a nivell ultraestructural (37). La fosfatasa àcida s'ha localitzat ultraestructuralment als grànuls, a les vesícules paranuclears, a la cisterna perinuclear i a regions de RER. No s'ha observat fosfatasa àcida a l'aparell de Golgi (16). Estudis ultraestructurals de la morfologia d'aquestes cèl·lules, obtingudes de pacients amb expansions de LGG, han conduït a la idea que les vesícules serveixen de reservori i transport de la fosfatasa àcida fins als grànuls. Les vesícules despreses de l'aparell de Golgi s'ajunten amb les vesícules alliberades pel RER, i que contenen fosfatasa àcida, per formar els cossos multivesiculars en els que es depositarà la matriu electrodensa que conferirà el caràcter madur al grànul (16).

Figura 3.A.1.3

A. FENOTIPUS DE LES CNK

Extensió de sang perifèrica (x1000) tenyida amb May-Gründwald-Giemsa.  
Limfòcit amb citoplasma ampli i grànuls atzuròfils abundants

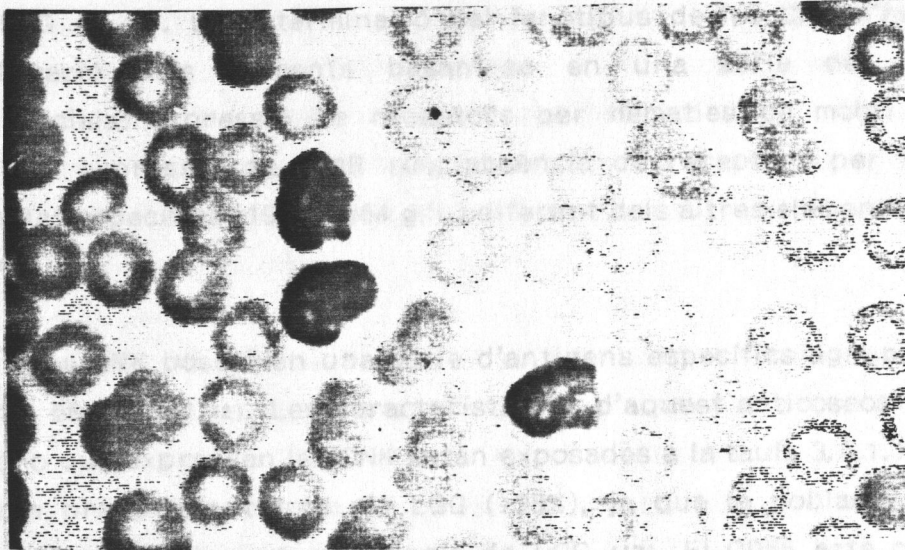


Figura 3.A.1.4

Imatge ultraestructural de LGG de sang perifèrica (x40.000). La fleixa assenya els PTA.





## A. FENOTIPUS DE LES CNK

L'ANK està mitjançada per una població morfològicament uniforme, els LGG (15,39). La determinació del fenotipus de les CNK s'ha fet per purificació dels elements basant-se en una sèrie de propietats diferencials: expressió de receptors per hematies de moltó de baixa afinitat, expressió de FcR (40), absència de receptors per C3 (40), i densitat específica (1062-1064 g/L) diferent dels altres elements cel·lulars (37,41).

Les CNK poseeixen una sèrie d'antígens específics agrupats en els CD 16, 56 i 57 (2,42). Les característiques d'aquest anticossos i la resta d'AcMo que expressen les CNK estan exposades a la taula 3.A.1.1. El CD56 abarca pràcticament tots els LGG (>95%), ja que la població CD56<sup>-</sup> no presenta elements amb morfologia de LGG (17). El CD56 està considerat com un pan-NK (2,42), si bé també s'expressa en un 5% de limfòcits CD3<sup>+</sup> que són limfòcits T<sub>ctx</sub> sense restricció al SMH (31). La molècula que reconeix el CD56 que està localitzada a la superfície i al citoplasma del LGG (31). Aquesta molècula no és un receptor funcional, ja que la citotoxicitat no es modifica si en el medi s'hi col·loca AcMo d'aquest cluster (2,31). No obstant la deplecció total de les cèl·lules CD56<sup>+</sup> de la CMN per *sorting* o lisi provoca la desaparició de la citotoxicitat (2,31). El CD56<sup>+</sup> està present en el 15 ± 7 % de les CMN de SP (4,13), el CD16 en el 9 ± 6 % de les mateixes i el CD57 en el 20 ± 7 %. El CD57 reacciona un 40-60 % de CNK (13) i amb una part de limfòcits CD3<sup>+</sup>, no sent completament específic de la CNK (31,43). La presència de CD57 no es relaciona amb la citotoxicitat de la població (43). La relació entre el CD16 i la citotoxicitat és motiu de controvèrsia. En uns treballs es correlaciona l'expressió de l'antigen amb la citotoxicitat (44) i en altres aquesta relació és inexistent (4,45).

Les CNK no expressen el CD3 ni el RCT (13,15,18,30-31,46-48), ni altres antígens propis de línia T com CD5 (18). En canvi **tenen una** expressió variable del CD2 (entre un 50-90%) (47-49) i del CD8 (entre el 10-50 %) (13-14,48-49). L'expressió del CD2 en la població CD16<sup>+</sup> té una intensitat

continua des del negatiu fins el positiu mentre que la població CD16<sup>-</sup> té dos grups diferenciats, positius o negatius, per l'antigen. La intensitat d'expressió del CD8 en els limfòcits CD16<sup>+</sup> és menor que la que presenten els limfòcits T (figura 3.A.1.5)(48). L'expressió de CD16 en els limfòcits CD3<sup>-</sup> és més intensa que en l'escàs percentatge de CD3<sup>+</sup> que coexpressen l'antigen (50). Seguint el mateix esquema d'intensitat d'expressió (més antigen NK a les CNK i més antigen T als limfòcits T) la intensitat del CD57 és més gran en la població CD16<sup>+</sup> (48). L'expressió conjunta de CD56 amb CD4 és molt poc freqüent [ $< 2\%$  (49,51),  $< 5\%$  (52)] per alguns autors i inexistent per altres (18).

Un 70% de CNK expressen CD11b, un marcador present també en els monòcits (14). A més de la reactivitat amb anticossos de línia T i monocitària, les CNK reaccionen amb altres anticossos en percentatges variables. D'aquesta manera expressen LFA-1 (cadena  $\alpha$  i  $\beta$ ), molècula inclosa dintre del complex CD11/CD18 (17-18,41), que és una proteïna lligada a l'adhesió cel·lular i necessària per la interacció amb la cèl·lula diana (veure figura 3.A.2.2). El percentatge de CNK que expressen HLA-DR varia segons els autors. Perussia *et al* (48) troben un 0,5% de limfòcits a SP positius pel CD16 i el HLA-DR, si bé aquesta proporció augmenta fins el 60 % en purificacions de LGG o després de períodes curts de cultiu. La discordància entre el percentatge de HLA-DR en SP i en cèl·lules obtingudes de cultiu o de purificacions no té encara una explicació concluent. Les hipòtesis inclouen l'augment de la població CD16<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> pels processos de purificació o bé l'activació de la població CD16<sup>+</sup> que expressaria el HLA-DR (48). Altres autors refereixen freqüències del 20% (16,45), i finalment alguns grups no troben quasi reactivitat amb aquest antigen (17,27). Les CNK expressen el CD38 (2,31), IL-2-R $\beta$  (p75) (53) i CD25 (17,30), antigens que estan presents en els limfòcits B i T o activats.

No s'ha demostrat reactivitat dels LGG amb marcadors de línia limfocitària B (IgS (11,15,18), receptors complement (15), CD21 (2,17), CD24 (48), CD20 (50)), ni amb antigens restringits de línia monocitària (CD14) (2,13,17).

Si bé el fenotipus de les CNK és heterogeni, la majoria tenen un fenotipus com el següent: CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, amb expressió variable de HLA-DR, CD2, CD8, CD57 (13). La taula 3.A.1.2 exposa el percentatge de limfòcits a SP que expressen marcadors associats a CNK, i les taules 3.A.1.3, 3.A.3.4 i 3.A.3.5 la freqüència dels antígens a les CNK.

La població NK també expressa antígens de superfície reconeguts per AcMo sense definició de CD. Un petit percentatge de LGG (el 4 % de la població SP) són reconeguts per l'AcMo NKH2 (17,43). La població de LGG es pot subdividir en tres grups segons l'expressió de CD56 i de NKH2: i) CD56<sup>+</sup>NKH2<sup>+</sup>, ii) CD56<sup>+</sup>NKH2<sup>-</sup> i, iii) CD56<sup>-</sup>NKH2<sup>+</sup>. Aquestes 3 poblacions fenotípiques posseeixen una morfologia idèntica, però unes capacitats funcionals diferenciades. L'ANK està continguda en el subgrup NKH2<sup>-</sup> mentre que el grup NKH2<sup>+</sup> no té capacitat lítica i la seva funció és encara desconeguda (17).

La capacitat lítica de les CNK en relació amb el fenotipus de superfície que expressen s'ha observat, a més de la població NKH2<sup>-</sup>, amb la població definida per CD16<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> (activitat lítica elevada) enfront de la CD16<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> (14) i la població definida per CD16<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup> (citotoxicitat elevada) front la CD16<sup>+</sup>CD11<sup>-</sup> (14,52).

Diversos fenotipus s'han relacionat amb certes funcions específiques (taules 3.A.1.6 i 3.A.1.7). Per exemple, la síntesi d'IL i IFN està restringida al grup amb expressió de determinants del sistema HLA-DR (31).

Recentment, Moretta *et al* (54) han descrit la presència d'una nova molècula detectada per l'AcMo GL183 a la superfície dels limfòcits NK. La presència d'aquesta molècula permet definir dues subpoblacions fenotípiques estables dintre de les CNK. La lisi que desenvolupa la població GL183<sup>-</sup> i GL183<sup>+</sup> és similar front línies NK-sensibles, però la GL183<sup>-</sup> és molt més efectiva en la lisi de les línies NK-resistents.

## B. MODELS MADURATIUS

El fenotipus que expressen les cèl·lules és diferent segons el seu estadi maduratiu. Les variacions fenotípiques de les CNK lligades a la diferenciació són motiu de controvèrsia. Abo *et al* (16,55), basant-se en les diferències observades entre els LGG de fetus, moll d'os i sang perifèrica d'adults proposa un model maduratiu en 3 fases: i) estadi fetal en el que la CNK no posseeix grànuls i únicament expressa el CD57 sent negatiu per CD3 i CD11 ii), estadi immadur en el que la CNK està localitzada a moll d'os o melsa, posseeix algun grànul al citoplasma i expressa CD57 i CD3 a la superfície sense posseir CD11 i, iii) estadi madur a SP on la CNK té la morfologia típica de LGG i expressa CD57 i CD11 negativitzant-se el CD3. Aquest model maduratiu inclou l'expressió, en una etapa immadura, del CD3 per perdre després aquest antigen. Les CNK no tenen reordenats els gens de les cadenes  $\alpha$ ,  $\beta$  del RCT, que és un pas previ necessari per l'aparició a la superfície cel·lular del CD3 (56). Possiblement l'anàlisi d'Abo *et al* inclogui cèl·lules que no són NK (ex: limfòcits T citotòxics), que comparteixen la morfologia de LGG.

Sheridan *et al* (57), basant-se en estudis fets en proliferacions de CNK, proposen un altre model maduratiu pels LGG. S'inicia a partir d'una cèl·lula fetal precursora  $CD57^+CD3^-CD4^-CD8^{\pm}CD11^+$  que, seguint un procés maduratiu independent del timus, conduirà a la formació de LGG  $CD3^-$ . La segona via parteix d'una cèl·lula fetal  $CD57^+CD3^-CD4^-CD8^-CD11^-HLA-DR^+$  que reordena el gen T $\beta$  en el fetge fetal o en el moll d'os per passar al timus fetal o adult ( $CD3^+CD4^+CD8^+$ ) i, un cop acabat el procés de maduració tímica, desplaçar-se a moll d'os, melsa o gangli limfàtic com un LGG madur  $CD57^+CD3^+CD8^+CD4^-CD11^+$ . Els dos tipus cel·lulars expressen CD2, i l'expressió de HLA-DR depèn de l'estat d'activació i el microambient on està localitzat el LGG.

Finalment, Phillips *et al* (22), utilitzant poblacions de LGG  $CD16^+CD57^+$ ,  $CD16^+CD57^-$ ,  $CD16^-CD57^+$  o  $CD16^-CD57^-$  purificades mitjançant separació amb citometria de flux, han demostrat i) que el CD57 apareix més tard que el CD16 i que les cèl·lules  $CD16^+CD57^-$  tenen més capacitat de proliferació que les que posseeixen els dos determinants antigènics,

ii) que la població CD16<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> no genera, després d'estimulació, població amb els dos antígens i, a més, expressa CD3. Aquest dos fets permeten assegurar que el CD16 apareix de forma més precoç que el CD57 (figura 3.A.1.6). Les CNK expressen també CD56 i, basant-se en l'escassa expressió de CD56 a moll d'os, la cèl·lula CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> es considera la més madura (45).

## Taula 3.A.1.1

## Característiques dels principals CD presents en les CNK

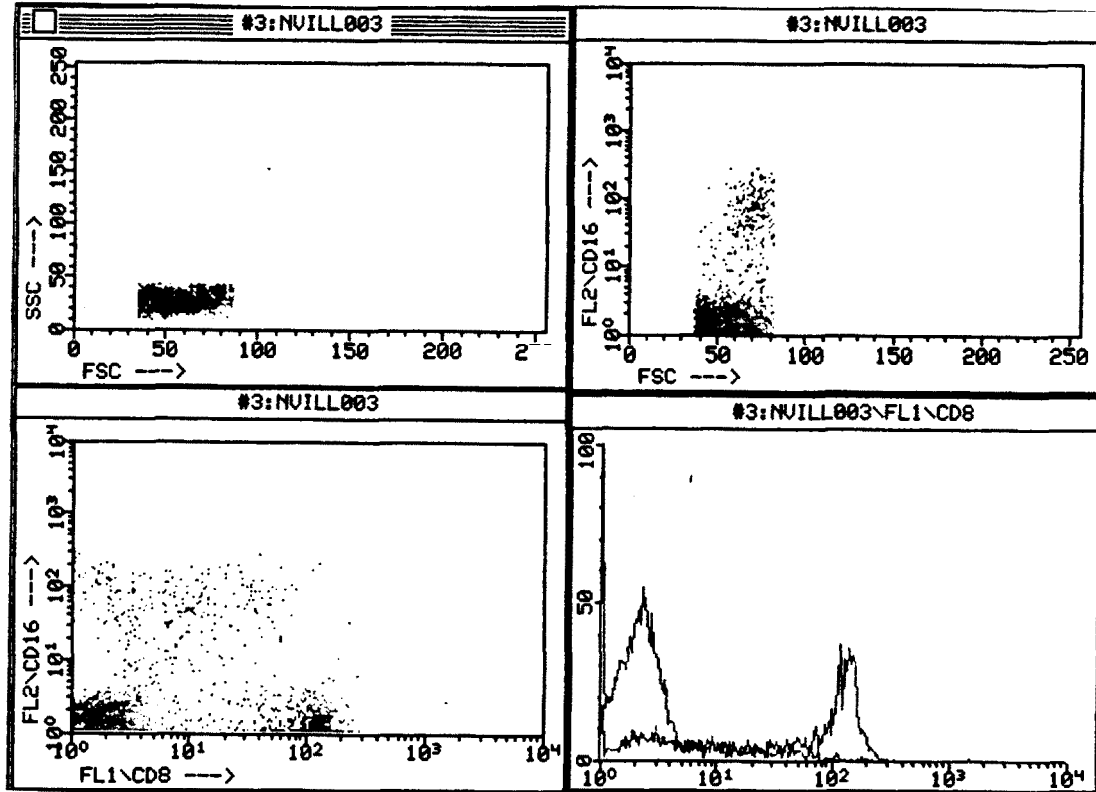
Cluster CD	Pes molecular (kD)	Característiques	Distribució cel·lular	Anticossos freqüents
CD16	50-60	FcRIII Polimorfisme (NA1 i NA2)	Granulòcits, alguns macròfags	NKLeu11, VEP13, B73.1, 3G8
CD56	220/135	N-CAM	NK, monòcits, c. neuroectod.	N901, Leu19 NKH1
CD57	110	glicoproteïna de mielina assoc.	NK, subpobl T alguns B, monoc.	Leu7 N66, N76
CD2	50	Receptor pel LFA-3 (CD58)	Limfòcits T, timòcits	OKT11, Leu5
CD6	32	Interacció SMH cl. I Assoc intrac. PTK	Subpoblacions timòcits i LT.	OKT8, Leu2
CD11b	170	Cadena $\alpha_M$ de CR3 CD11/CD18	Grànuls, monòcits macròfags	Leu 15, OKM1
---	60	---	NK, basòfils	NKH2
---	55-58	---	Subpoblació NK	GL183

N-CAM= Neural cell adhesion molecule

tret de (2,42,54)

Figura 3.A.1.5

Intensitat d'expressió dels antígens CD16 i CD8 per part dels limfòcits de SP.



En el primer requadre s'observa la imatge dels limfòcits (tamany per complexitat cel·lular). Al segon requadre es veu com aquells limfòcits CD16<sup>+</sup> (color verd) estan dintre dels de major tamany. Al tercer i quart requadre es pot veure la distribució i intensitat de CD16 i CD8 en limfòcits de SP normal. La població verda és la CD16<sup>+</sup> i la població vermella conté la resta de limfòcits (CD16<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> o CD16<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>). A la superposició d'histogrames (requadre 4) s'objectiva com la intensitat d'expressió de CD8 per part dels limfòcits CD16<sup>+</sup> és més dèbil que en els CD16<sup>-</sup>.

Taula 3.A.1.2

Percentatge de població limfocitària de sang perifèrica que expressa antigens relacionats amb CNK

CD	Valors normalitat (%)
CD2	58 - 86
CD3	53 - 81
CD8	13 - 23
CD11	10 - 30
CD16	5 - 20
CD57	5 - 20
CD56	5 - 20
HLA-DR	< 2
CD38	30 - 50
NKH2	7
GL183	2 - 12

Referències (2,45,54)



Taula 3.A.1.3

Percentatge d'expressió dels diversos antígens en els limfòcits CD16<sup>+</sup>

CD	Valor de normalitat (%)	Referència
HLA-DR	18 - 33	(45)
CD57	30 - 65	(45,53)
CD8	20 - 30	(45,52)
CD56	80 - 95	(45)
CD11b	38 - 92	(14,52)
CD38	60 - 64	(52)
GL183	40	(54)

Taula 3.A.1.4

Percentatge d'expressió dels diversos antígens en els limfòcits CD56<sup>+</sup> i CD16<sup>+</sup>

CD	LIMFOCITS CD56 <sup>+</sup>		LIMFOCITS CD16 <sup>+</sup>	
	Normalitat (%)	Referència	Normalitat (%)	Referència
HLA-DR	2 ± 2	(45,58)	18 - 33	(45)
CD3	2 ± 1	(58)	---	---
CD4	1 ± 1	(58)	---	---
CD8	27 ± 6	(14,58)	20 - 30	(45,52)
CD2	74 ± 10	(58)	---	---
CD11b	80 ± 16	(14,58)	38 - 92	(14,52)
CD57	85 ± 14	(14,43,58)	30 - 65	(43,45)
CD16	31	(43)	---	---
GL183	40	(54)	40	(54)
IL-2R $\beta$	34 ± 3	(53)	11 ± 3	(53)
CD56	---	---	80 - 95	(45)
CD38	---	---	20 - 30	(52)

Taula 3.A.1.5

Distribució dels antígens de superfície en les CNK

CD	Normalitat (%)
CD56	> 95
NKH2	20 - 60
CD16	80 - 90
CD11a	> 95
CD11b	80 - 90
CD11c	> 95
CD18	> 95
CD57	50 - 70
CD2	80 - 90
CD8	30
CD38	75 - 90

Referència (2)

## Taula 3.A.1.6

Distribució dels LGG segons els fenotipus de superfície i funcions que s'hi associen

Fenotipus	Percentatge de LGG	Activitat		Reordenament
		NK	ADCC	RCT
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	90 %	++	++	NO
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	5 %	+	-	NO
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	<1 %	+	+	NO
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>±</sup>	5 %	+	+/-	α, β, τ

RCT = receptor de cèl·lules T

ADCC = citotoxicitat cel·lular anticòs-depenent

*Referència (31)*

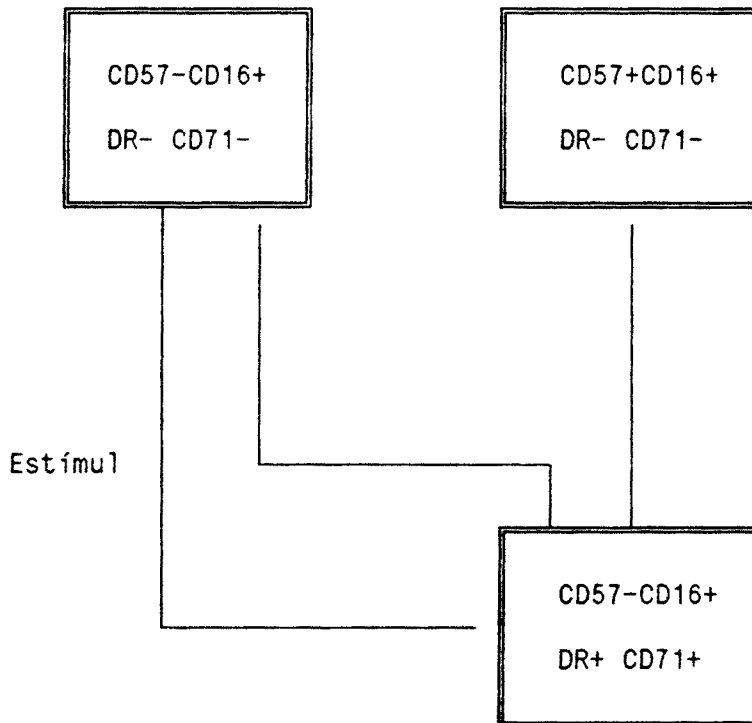
Taula 3.A.1.7

Distribució dels LGG segons els fenotips de superfície i funcions que s'hi associen

Fenotipus	Producte/Funció	Referència
CD16 <sup>+</sup> CD2 <sup>±</sup> CD11 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	Interleuquina 1	(13,31)
CD16 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup> CD11 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>±</sup>	Interleuquina 2	(31)
CD16 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup> CD11 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>-</sup>	Interleuquina 4	(31)
CD16 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup> CD11 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>-</sup>	BCGF	(13)
CD16 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup> CD11 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup>	α - Interferó	(31)
CD16 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup> CD11 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	τ - Interferó	(13,31)
CD16 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup> CD11 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup>	NKCF	(31)
CD16 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup> CD11 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	Presentació antígens	(59)
CD16 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup> CD11 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup>	Citotoxicitat per cel.	(13)
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup> CD11 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup>	BCGF	(60)
CD16 <sup>-</sup> CD57 <sup>+</sup> CD11 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup>	BCGF	(61)
CD16 <sup>+</sup>	CSF	(31)
CD16 <sup>+</sup>	α TNF	(31)

Figura 3.A.1.6

Variacions fenotípiques en LGG CD16<sup>+</sup> segons l'estadi maduratiu i l'activació.



L'estímul provoca l'aparició d'antigens d'activació cel·lular (HLA-DR i CD71) que conduiran a la cèl·lula més madura (CD57<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) o bé retornarà a l'estat basal (CD16<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>)

CD71 = receptor per la transferrina

Segons Phillips et al (22)

## FUNCIONALISME DE LES CEL·LULES NATURAL KILLER

L'activitat que les CNK exerceixen dintre de l'organisme és molt àmplia. Per les seves múltiples accions sobre les diverses cèl·lules del sistema immune se les considera reguladores del mateix (47). Les CNK modifiquen la resposta de limfòcits B i T; produeixen citoquines efectives sobre els diversos elements del sistema immunològic; regulen l'hemopoesi; controlen el creixement de les cèl·lules neoplàsiques i lisen cèl·lules infectades per microorganismes patògens. La taula 3.A.2.1 recull les principals funcions de les CNK.

### 1. Control de l'hemopoesi

Les CNK desenvolupen funcions reguladores sobre la maduració i diferenciació de cèl·lules normals a nivell del timus i moll d'os, controlant l'hematopoesi normal per lisi de cèl·lules immadures i per acció sobre els limfòcits T. Estudis *in vitro* demostren que les CNK inhibeixen la maduració de les colònies granulopoètiques (11,16,30,62) i eritroides (63), i que també impedeixen el creixement de clones leucèmiques mieloides i limfoides (64). Aquest efecte inhibidor s'ha demostrat *in vivo* en experimentació animal (65-66). L'efecte inhibidor sobre l'hemopoesi és degut a la producció de substàncies actives per part de les CNK, com pot ser la producció i l'alliberament de TNF (65). La producció de TNF s'inicia després del contacte de la CNK amb la cèl·lula hemopoètica diana i es veu potenciat pel  $\tau$ -IFN (67).

Recentment s'ha descrit un efecte estimulador per part de les CNK sobre les colònies hemopoètiques (68). Les CNK produeixen GM-CSF, CSF-1 i IL-3 (65). La producció *in vitro* de GM-CSF és estimulada per via del receptor CD16, mentre que la producció *in vitro* d'IL-3 és estimulada mitjançant ionòfors del calci o esters de forbol. La IL-3 és capaç de mantenir el creixement i la diferenciació de stem cell pluripotent (68). La producció de citoquines (IL-1, IL-3 i TNF) s'observa tant en estats d'activació de la CNK com en situació de repòs (68). El fet que CNK sense estimular sintetitzin aquests factors dóna suport al concepte del seu

paper de regulador dels progenitors hemopoètics (68). La cinètica de producció de les diverses substàncies amb efecte sobre l'hemopoesi ha posat de manifest que es produeixen més ràpidament **substàncies** amb acció inhibidora (65). L'efecte i la capacitat **estimuladora** sobre els precursors hemopoètics és menor que la provocada **pels limfòcits T** (67).

## 2. Control de cèl·lules neoplàsiques

L'activitat antitumoral de les CNK està plenament demostrada en experimentació animal. Sobretot controlen el creixement del tumor primari i el desenvolupament de metàstasi (30) més que participar en la lluita contra les metàstasis un cop s'han establert (46). En ratolins s'ha observat una relació directa entre la capacitat per fer desaparèixer cèl·lules tumorals injectades i l'ANK dels animals, i entre l'augment de les metàstasis i la deplecció experimental de CNK (47).

En l'home, fets indirectes suggerien l'important paper que les CNK tenen en el control de neoplàsies, si bé no s'ha disposat de dades concluints fins fa poc (4). Els malalts portadors de neoplàsies tenen una ANK disminuïda, mentre que els llargs sobrevivents fora de tractament tenen alts nivells de citotoxicitat (16). La disminució de l'ANK es relaciona sobretot amb la disseminació de la neoplàsia, ja que pacients amb grans masses tumorals localitzades poden posseir una ANK normal (16). Recentment s'han publicat treballs que demostren el gran impacte de la CNK en el control de les cèl·lules neoplàsiques (69-70), associant-se nivells baixos de citotoxicitat amb major risc per desenvolupar neoplàsies, i demostrant que l'ANK és un factor pronòstic independent en certs tumors sòlids humans. D'aquesta manera els estudis han demostrat la influència independent que l'ANK té en la supervivència lliure de metàstasi en malalts cancerosos (neoplàsies de coll i cap). En pacients afectats de neoplàsies mamàries el factor de més pes pronòstic és el nombre de ganglis afectats. Nogensmenys existeix correlació **entre l'ANK elevada i el menor nombre de ganglis positius per infiltració neoplàsica**. En aquest mateix sentit, la no aparició de metàstasi en **pacients amb càncer colorectal** intervingut està relacionat amb la normalització de l'ANK després de la cirurgia. També s'ha confirmat que individus amb ANK



disminuïda de forma congènita (Chediak-Higashi) o adquirida (immunodepressió terapèutica) tenen més risc de desenvolupar neoplàsies (4,25,47). Juntament amb aquestes dades extreïdes d'individus amb patologia, els nivells baixos d'ANK en individus aparentment sans s'associa a història de neoplàsies familiars (melanoma i carcinoma mamari) (4).

### 3. Control de les infeccions

Les CNK desenvolupen activitat antimicrobiana actuant sobre cèl·lules infectades per virus (herpes virus, CMV, influenza, etc) (30,71), per lisi directa de la cèl·lula infectada o per lisi de cèl·lules lligades a anticossos específics (47). Actualment les CNK són considerades la primera línia defensiva contra infeccions virals mentre es desenvolupa la resposta Ag-Ac o la resposta cel·lular (4). Les CNK, al contactar amb la cèl·lula infectada, sintetitzen IFN, que estimula la seva pròpia funció i la dels limfòcits T (4). A més d'aquest mecanisme de lluita directa contra la infecció, els LGG responen a factors quimiotàctics produïts pels limfòcits infectats (72-73) i formen part de la cel·lularitat inflamatòria precoç (74). A les 12 hores d'iniciada la infecció es localitzen gran nombre de LGG en la zona afectada (75). Els estimuladors més potents de la migració dels LGG a la zona d'inflamació són potents estimuladors de la proteïna quinasa C, i la migració és bloquejada pels inhibidors d'aquesta enzima, indicant el paper que té la mateixa en la quimiotaxi (76).

La seva importància en el control de la infecció s'ha comprovat en animals d'experimentació. En ratolins, la resistència a infeccions víriques està directament relacionada amb l'ANK (47). En patologia humana, el paper de les CNK en el control d'infeccions víriques no és tan concluent. S'ha demostrat *in vitro* la inhibició de la replicació del virus de l'herpes simple (HSV) per les CNK (77). A nivell clínic, diverses situacions patològiques recolzen la funció anti-vírica dintre de l'organisme. En primer terme, els nadons tenen menor resistència a les infeccions víriques, fet que sembla relacionat amb el dèficit fisiològic d'ANK que tenen, i s'ha associat la infecció per herpes simple amb els nivells d'ANK (47). En aquesta mateixa línia, les immunodeficiències humanes amb

alteració de la funció NK, per exemple la immunodeficiència lligada al cromosoma X o el dèficit de glicoproteïnes leucocitàries de superfície, presenten infeccions víriques greus (4,16,26). La gravetat de les infeccions víriques en pacients amb immunodeficiència **iatrògena** està en relació directa amb l'ANK (4). En els malalts amb **SIDA**, a més de l'eliminació selectiva en els limfòcits CD4 (78) s'observa una disminució de l'ANK amb una capacitat de reciclatge defectuosa per part de les CNK (79). Aquest fet podria contribuir a l'augment de viràsis en aquests malalts, sobretot quan s'ha demostrat que el HIV infecta també les CNK (80-81).

El paper antimicrobià de les CNK s'estèn també a bacteris gram positius i gram negatius mitjançant, en part, un mecanisme extracel·lular (82), a fongs com el *cryptococcus neoformans*, *histoplasma capsulatum*, i sobre paràsits (*toxoplasma gondii* i *trypansomoma cruzii*) per unió i lisi directa (30,82). Recentment, estudis *in vitro* han demostrat que una part de LGG són capaços de fagocitar *staphilococcus aureus* i altres gèrmens Gram positius. La fagocitosi que exerceixen és tres vegades inferior a la dels monòcits i s'acompanya de producció d'IL-1 i  $\tau$ -IFN (83). L'estimulació de les CNK per agents microbians millora l'efecte antitumoral de les mateixes (82).

#### 4. Regulació del sistema immune

##### a. Producció de citoquines

La producció de citoquines per part de les CNK és àmplia. Produeixen  $\alpha$ -IFN i  $\tau$ - després del contacte amb la cèl.lula diana (11,30,35), IL 1, 2 (84), 3 (85) i 4 (15,31). També s'ha demostrat la producció de *T cell growth factor* (TCGF), colony stimulating factor (CSF) (47), GM-CSF (85), *B cell growth factor* (BCGF) (80), TNF (15), limfotoxina (85), citolisina (65kD) (15), granzima A (86), perforina (70kD) (87) i factor quimiotàtic dels macròfags (31). L'alliberament d'aquests productes desemboca en dues funcions: la primera és actuar sobre limfòcits i altres elements del sistema immune configurant el complex equilibri d'aquest sistema (figura 3.A.2.1) i, en segon lloc, proporciona els productes

necessaris per la lisi de la cèl·lula diana.

El *natural killer cytotoxic factor* (NKCF) és una estructura bioquímica encara no totalment coneguda, però que s'inclou dintre del grup de TNF, limfotoxina i leucoregulina, que tenen un paper fonamental en la citolisi contra cèl·lules infectades i tumorals (85). El contacte amb la cèl·lula diana provoca la síntesi de NKCF per part de la CNK (85), correlacionant-se la capacitat de síntesi de NKCF per part de les cèl·lules diana amb la seva sensibilitat a la lisi (31). A més, el NKCF és selectivament lític per les cèl·lules dianes NK sensibles (31). La producció de NKCF es pot augmentar per incubació prèvia de les CNK amb  $\tau$ -IFN o IL-2 (31,85). S'ha aconseguit produir NKCF per estímul de CNK amb mitògens (PHA) (85). La relació existent entre el NKCF i el TNF és controvertida, des d'uns treballs on l'acció de NKCF és inhibida completament per l'addició d'AcMo anti-TNF (88), només parcialment inhibida (89) fins a treballs on no té cap mena d'influència (90-91). La lisi de les cèl·lules diana té lloc per l'alliberament de citolisina (92) i perforina (87).

#### b. Resposta humoral

Les CNK regulen l'activitat funcional dels limfòcits B. En determinades situacions les CNK sintetitzen BCGF que és necessari pel creixement i diferenciació dels limfòcits B (92). Els limfòcits B activats *in vivo* o *in vitro* expressen a la seva superfície receptors pel BCGF i la unió amb aquesta substància indueix la proliferació limfocitària. Les CNK produeixen BCGF (60,92) després d'estimulació i afavoreixen la producció de BCGF per part dels limfòcits B activats (92).

Les CNK influeixen en la producció d'Ig dels limfòcits B. El mecanisme de regulació no està encara totalment determinat, però poden exercir tant funcions inhibidores com afavoridores de la síntesi d'Ig (93-94). Els mecanismes d'inhibició de la producció d'Ig referits en estudis experimentals ofereixen diverses vies d'acció: i) acció directa de les CNK sobre els limfòcits B (93,95), ii) modulació mitjançant cèl·lules accessòries (47), iii) regulació mitjançant citoquines ( $\tau$ -IFN) (74) i iv) inducció directa

de limfòcits T supressors dels B, sense estar involucrats els mecanismes anteriors ni la producció de citoquines (IL-1, IL-2, IFN) (71). L'afavoriment en la síntesi d'Ig sembla mediada per una substància soluble que és regulada per la presència d'immunocomplexos (93). Les CNK participen en la regulació de la resposta d'anticossos, però només poden actuar sobre els limfòcits B activats (96). L'increment de l'ANK determina el final de la producció d'Ig M de resposta primària en ratolins immunitzats activament (47,97), i la deplecció mitjançant AcMo de les CNK provoca un augment *in vivo* de la resposta d'anticossos (62). La regulació de l'estímul dels limfòcits B és produïda per un mecanisme d'autocontrol del sistema immune. Els limfòcits B activats indueixen la síntesi i l'alliberament de  $\tau$ -IFN per part de les CNK, que per una part inhibeix la proliferació B policlonal (62,74) i per altra augmenta la capacitat de lisi de les CNK. Les CNK poden suprimir la producció policlonal d'Ig induïda pels limfòcits T (93). La regulació (*down regulation*) de la síntesi d'Ig es produeix tant en respostes primàries com secundàries (98). A més, els estudis immunoarquitecturals de gangli limfàtic han posat de manifest que els limfòcits CD57<sup>+</sup> (antigen expressat per CNK) es localitzen a la zona B del mateix, lloc des d'on exerciran la seva funció reguladora. Paral·lelament, en pacients amb dèficit d'ANK s'ha observat un augment en la població B i en la producció d'Ig (99), com també s'ha relacionat el nivell d'immunocomplexes i la disminució de l'ANK en malalts de LES (4,12).

### c. Regulació resposta cel·lular

Les CNK participen en la resposta immunitària cel·lular i regulen les cèl·lules supressores naturals (30). Les poblacions purificades de limfòcits T necessiten de cèl·lules adherents accessòries (ex: LGG) per poder proliferar sota l'estímul de la concavalina A (37). La inducció a la proliferació dels limfòcits T és mitjançada per la capacitat dels LGG de presentar Ag nous o, en limfòcits de memòria, Ag ja coneguts (ex: PPD) (37). Aquesta presentació d'Ag es produeix tant en Ag solubles com en Ag cel·lulars (ex: en el culti limfocitari mixte) (59). Els LGG inhibeixen la producció IL-2 dels limfòcits T estimulats (84). No obstant, quan en les condicions experimentals existeix una petita proporció de LGG, l'efecte

sobre la producció d'IL-2 és positiu (84). Els LGG també modifiquen els efectes dels monòcits en la presentació d'antígens en els limfòcits T, existint una cooperació entre els dos tipus cel·lulars per la inhibició del limfòcit T (84).

### 5. Rebuig d'empelts

Les CNK participen en el rebuig dels empelts, ja siguin òrgans sòlids o transplantaments de moll d'os (30,47). L'abolició de la població NK, en animals d'experimentació, impedeix el rebuig de l'empelt al·logènic que es produirà si s'inoculen CNK abans del transplantament (47). En patologia humana, s'ha descrit un pacient amb AMG en el que l'empelt singènic va fallar per dues vegades abans de fer l'acondicionament amb dosi elevada de CFM. En aquest malalt es va demostrar inhibició del creixement de les colònies granulomonocítiques (GM-CFG) del donant pels LGG del receptor (100). També, en pacients sotmesos a empelts de ronyó, s'ha observat associació entre augments d'ANK i els episodis de rebuig de l'òrgan (101).

La participació de les CNK en la malaltia de l'empelt contra l'hoste (MECH) és reconeguda (62). La relació entre les CNK i el desenvolupament de la MECH és evident en estudis fets en ratolins. La relació entre l'ANK i el desenvolupament de la MECH en TMO humans s'ha establert en base a diversos estudis que demostren: la coincidència entre el temps de recuperació de l'ANK post-transplantament i l'aparició de la patologia; relació entre l'ANK i l'aparició de la MECH i el grau de lesió histopatològica (102-103); el desenvolupament de MECH en aquells malalts que tenen una ANK normal prèvia al TMO. Nogensmenys, els diferents estudis fets en malalts sotmesos a TMO no analitzen les mateixes dades i no exposen les descrites en les altres publicacions per una anàlisi posterior. Les dades publicades no són completament coincidents; així, Dokhelar *et al* (103) refereixen que tots els seus **pacients** tenien l'ANK disminuïda i desenvolupen MECH en contra de l'exposat per López *et al* (104), si bé aquests últims no analitzen el dia d'aparició de l'ANK després del TMO.

Taula 3.A.2.1

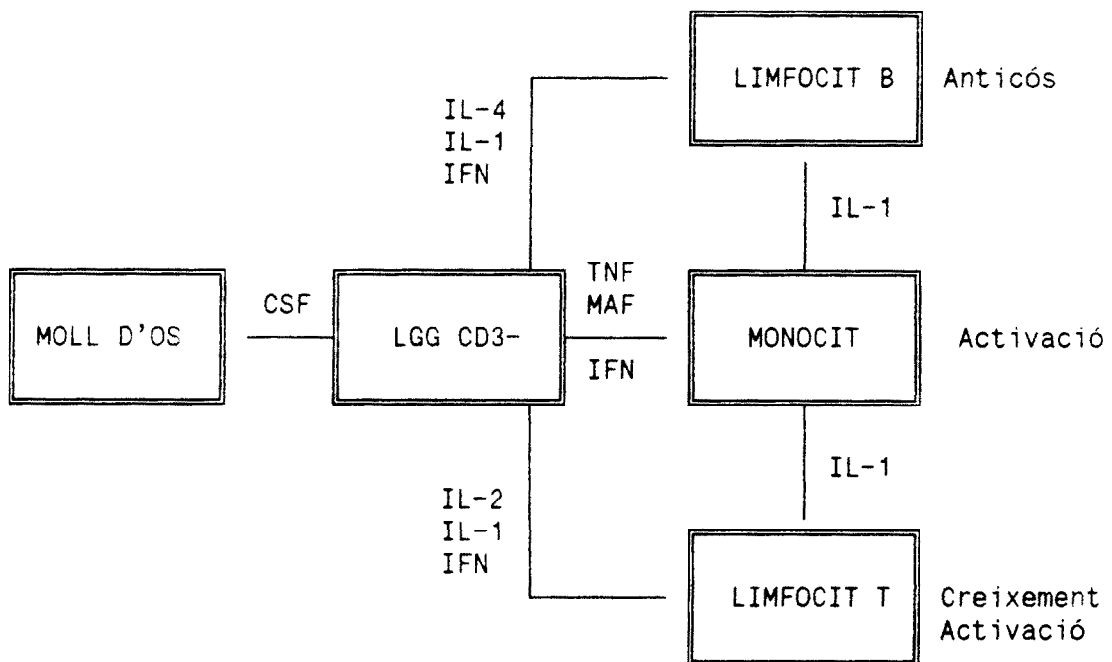
FUNCIONS FINS L'ACTUALITAT EN QUE S'INVOLUCRA LES CNK

1. **Control de la diferenciació i creixement de la stem cell hemopoètica**
2. **Control del creixement tumoral**
  - Inhibició del desenvolupament de tumors primaris
  - Control en l'aparició de metàstasi
3. **Control d'infeccions microbianes**
  - A. Virals (CMV, Influenza, Herpes, HIV, etc.)
  - B. Paràsits (intracel·lulars i extracel·lulars)
  - C. Fongs
  - D. Bacteris
4. **Producció de citoquines**
5. **Propietats immunoreguladores**
  - A. Regulació de la resposta d'anticossos
  - B. Regulació de la resposta mitjançada per cèl·lules
  - C. Cèl·lules supressores naturals
6. **Involucrament en el rebuig d'empelts al·logènics**
  - A. TMO i resistència híbrida
  - B. Transplantaments d'òrgans
7. **Estats patològics**
  - A. Involucrament en el desenvolupament de la MECH
  - B. Contribució en algunes formes d'anèmia aplàstica i neutropènia
  - C. Potenciació de patologia autoimmune i malalties neurològiques
  - D. Contribució en el desenvolupament de certes formes de diabetis

**Referència (30)**

Figura 3.A.2.1

Representació esquemàtica dels efectes i mitjancers dels LGG sobre altres estirpes cel·lulars



CSF = *colony stimulating factor*  
 IL = interleuquina  
 IFN = interferó  
 MAF = factor d'activació dels macròfags  
 TNF = *tumor necrosis factor*

Referència (31)

## REGULACIO DE L'ANK

### 1. Condicions biològiques

La citotoxicitat canvia d'un individu a un altre amb una distribució gaussina entre la població. Malgrat les diferències interindividuals, cada persona tendeix a expressar sempre una ANK similar. La resposta NK es veu influïda per diverses condicions fisiològiques com l'edat, el sexe (36), l'exercici. L'ANK té un ritme circadià amb un màxim d'activitat al matí (4).

Els nivells de citotoxicitat en els primers 4 anys de vida són inferiors als de la vida adulta (105). A partir d'aquesta edat l'ANK es manté fins la senectud (106). Si bé l'ANK es manté en el transcurs dels anys, la proporció de cèl·lules CD16<sup>+</sup> augmenta amb l'edat (45,107). Aquest augment de cèl·lules CD16<sup>+</sup> manté la citotoxicitat a la vellesa, en que hi ha més CNK, però són menys efectives (107). La citotoxicitat a les dones pot ser menor que en els homes (36).

En individus normals s'observen increments en la citotoxicitat immediatament després de l'exercici físic intens, independentment de l'entrenament. El màxim increment s'obté a les dues hores per retornar lentament a la normalitat a les 20 hores. Paral·lelament s'incrementen el nombre de cèl·lules CD57 i CD16 positives amb disminució de CD3 i CD4 (108).

Durant l'embaràs disminueix el nombre de CNK, però mantenen la mateixa capacitat d'unió, lisi i reciclatge (109). Els canvis fenotípics de l'embaràs consisteixen en increments de la població CD57<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup>, i en el període post-part augmenta la població CD57<sup>+</sup> (110).



La distribució de LGG varia segons els teixits analitzats i, de la mateixa manera, l'ANK que són capaços de provocar. Les mostres amb més reactivitat són les obtingudes de sang perifèrica i melsa, i tenen baixa reactivitat les de moll d'os, ganglis limfàtics, pulmó i epíteli bucal (13,60,75).

## 2. Regulació per limfoquines i altres substàncies

L'ANK pot ser modificada, augmentada o disminuïda, per la intervenció de diversos factors. En l'apartat anterior s'han exposat les modificacions degudes a estats fisiològics. No obstant, un gran nombre de productes biològics poden modificar l'ANK.

L'IFN ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\tau$ ) és un potent estimulador de l'ANK tant *in vivo* com *in vitro* (11,13). Altres estimuladors de l'ANK són la IL-1 (111), la IL-2, productes bacterians, cimetidina (13,112-113), l' $\alpha$ -TNF (111). La infecció viral provoca un augment de citotoxicitat durant el període de control de la mateixa (4), probablement per l'alliberament de substàncies biològiques com l'IFN. Dintre de les substàncies que disminueixen l'ANK estan les prostaglandines (PGE) (114), la vitamina D<sub>3</sub> (114-115), nucleòtids cíclics (AMPC), esters de forbol, carcinògens, ciclofosfamida, prednisona, inhibidors de la síntesi proteica i fosfolipasa (13). També poden inhibir l'ANK cèl·lules adherents i no adherents (13).

L'IFN augmenta de forma potent l'ANK. L'IFN  $\alpha$  i  $\beta$  augmenten la proporció de cèl·lules que es lliguen a la diana, sobretot en dianes sensibles a la lisi per CNK. També augmenta la velocitat de lisi i el reciclatge de LGG, així com la producció de NKCF (31). Per tant, l'IFN augmenta el nombre, l'efectivitat i la velocitat de recuperació de les CNK i promou el pas de cèl·lules pre-NK a CNK (13). La majoria de productes que indueixen la producció d'IFN provoquen augment de l'ANK. La patologia humana que s'associa a defectes de producció d'IFN comporta una disminució de l'ANK.

Un altre potenciador de la citotoxicitat és la IL-2 (118). Els LGG tenen receptors de baixa afinitat per IL-2 i creixen sota el seu estímul, (112) jugant un paper fonamental en l'estimulació la unió de la IL-2 amb la subunitat p75 del R-IL-2 (116). La IL-2 indueix la producció de  $\tau$ -IFN i millora la lisi incrementant la cinètica (118). La IL-2, a part de potenciar l'ANK, estimula la producció d'ADN i la divisió cel·lular, cosa que no s'observa amb l'IFN (117). L'estimulació de les CNK via CD16 provoca l'augment de receptors per la IL-2 (112).

L' $\alpha$ -TNF augmenta la citotoxicitat de les dianes NK-sensibles i les NK-no-sensibles (111). L'efecte del TNF sobre l'ANK es potencia per l'associació amb dosis baixes d'IL-2, possiblement perquè la incubació amb TNF provoca l'aparició de receptor per la IL-2 o les cèl·lules CD16<sup>+</sup> (111). La milloria en la lisi produïda pel TNF no és deguda a la lisi directa de la diana per la substància ni per augment en l'expressió de LFA-1, per tant l'efecte del TNF sobre l'ANK pot ser produït directament per la citoquina o per facilitar l'acció de la IL-2 (111). La IL-1 potencia l'ANK per interacció amb la diana i per inducció de molècules d'adhesió a diana (111).

Les estructures moleculars involucrades en l'activació de la CNK no estan perfectament definides. No obstant, l'addició d'AcMo anti-CD2 (118) i anti-CD16 (118-120) provoquen l'estímul de la CNK i s'assisteix a un augment del calci iònic intracel·lular, increment de la capacitat citotòxica i producció de citoquines. Moretta *et al* (54) defineixen una nova molècula de 55-58 KDa a la superfície dels limfòcits NK, reconeguda per l'AcMo GL183, que estimula els mecanismes de lisi de les CNK i a més és capaç d'exercir una funció reguladora de la citotoxicitat. Els gangliòsids també tenen un paper regulador en la citotoxicitat. Els gangliòsids de les cèl·lules diana poden actuar com estructures de reconeixement per la CNK i, d'altra banda, durant el creixement tumoral els gangliòsids sèrics poden inhibir les CNK contribuint a debilitar la seva funció antitumoral

de les CNK (121).

La inhibició de l'ANK es pot produir a nivell del reconeixement de la diana, de la unió amb la diana i dels esdeveniments postunió (13). La majoria d'inhibidors actuen després de la unió amb la diana (PGE, cAMP) (13). Entre les substàncies que inhibeixen la unió estan l'EDTA, els esters de forbol i les proteases (13). La incubació amb la diana produeix l'exhauriment de la CNK per deplecció dels grànuls o bé per la producció d'una substància que disminueix la lisi (112).

### 3. Regulació cel·lular

El *natural killer stimulating factor* (NKSF) és una glicoproteïna de 70 kDa sintetitzada pels limfòcits B estimulats. El NKSF permet la proliferació continuada de clones NK (122), provoca la síntesi de  $\tau$ -IFN per part dels LSP i augmenta la citotoxicitat natural, essent l'estimulador més potent dels LGG CD16<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>.

L'absència d'ANK en mostres de moll de l'os és deguda a la presència de cèl·lules adherents que inhibeixen la citotoxicitat i no apareixencara que s'afegeixin substàncies estimuladores de l'ANK (IL-2,  $\beta$ -IFN) (123). L'efecte cel·lular inhibidor sobre l'ANK també s'ha observat en poblacions purificades de SP. Les cèl·lules responsables de la inhibició són monòcits que han d'actuar en un medi que contingui IL-2 (124).

La interrelació de les CNK amb la resta de poblacions cel·lulars també s'ha observat a l'analitzar els canvis d'ANK en incubacions de CMN total de SP, de població T i no-T aïllades. Mentre que la incubació de la CMN provoca l'abolició de l'ANK, la incubació de les poblacions aïllades no modifica l'ANK (125).

#### 4. Bases genètiques

L'activació de les CNK provoca una sèrie de canvis en el genoma d'aquestes cèl·lules. Després de l'estimulació de CNK per mitjà de IL-2 o IFN s'observa un ràpid augment d'ARNm del gen *c-myb*, que estaria involucrat en la regulació de l'ANK (117).

## MECANISMES DE LISI DE LES CNK

La lisi que provoquen les CNK requereix que s'acompleixin una sèrie d'etapes: i) reconeixement de la diana, ii) adhesió, iii) dispar de la CNK, iv) activació i reorientació de les organelles citoplasmàtiques i grànuls, v) secreció, vi) unió dels factors alliberats a la diana, vii) canvis a la diana, viii) mort de la diana i ix) reciclatge de la CNK (126).

Encara no es coneixen amb tota la seva amplitud els factors i estructures involucrats en el procés de la lisi. Una de les principals incògnites és el mecanisme de reconeixement que utilitzen les CNK. No reconeix per Ig, ni mitjançant el complex RCT, ni per molècules del SMH (127). No obstant, la presència de  $\beta$ 2-microglobulina s'ha relacionat amb la sensibilitat per la lisi NK (128) així com canvis en l'expressió en la regió HLA del cromosoma 6 (129).

Darrerament s'està avançant en el coneixement del receptor de la CNK. Així, Ortaldo *et al* han descrit la creació d'un AcMo que reconeix una estructura de 80 kD present en els LGG i que bloqueja la unió i la lisi de la cèl·lula diana. El pretractament amb aquest AcMo provoca la síntesi de  $\tau$ -IFN (Herberman89 221-225). Per tant aquest AcMo (anomenat No. 36) apleix les característiques funcionals (reconeixement i síntesi IFN) necessàries per a ser el receptor de CNK. En el mateix sentit Harris *et al* (130) han descrit dos AcMo (5C6, 6D3.2) que reaccionen selectivament amb LGG i que inhibeixen l'ANK per inhibició en la formació de conjugats amb les cèl·lules diana. Aquests AcMo reconeixen unes estructures de 43 i 38 kD respectivament a la superfície dels LGG. Per tant, pel que s'acaba de mencionar es veu la progressió en la recerca del receptor de CNK, si bé els resultats dels dos grups de treball no són concordants en la hipotètica estructura receptora. Bergelson *et al* (121) i Kay *et al* (131) involucren els gangliòsids com l'estructura de reconeixement de la diana.

Un cop s'ha reconegut la diana es produeix la unió amb la mateixa. En la unió juguen un paper fonamental les molècules d'adhesió del grup LFA com el CD2 (receptor per LFA-3), el CD11b (component LFA-1). Recentement s'ha demostrat que el CD56 és una isoforma de la molècula d'adhesió neural (N-CAM) i que està involucrada en la unió amb la diana (132) (figura 3.A.2.2). Després de la unió s'ha de produir el *triggering* de la CNK. Les molècules involucrades en aquest pas tampoc són totalment conegudes. No obstant, a la superfície de la CNK existeix una molècula de 48 kD que podria ser responsable d'aquest efecte (126). Les senyals transmembrana generades per la unió produeixen un augment del metabolisme fosfatidilinositol a les CNK, possiblement per mitjà de la proteïna-quinasa C (PK-C), un flux de  $Ca^{2+}$  i  $K^+$  (133), reorientació dels grànuls i alliberament de diverses substàncies lítiques contingudes en els mateixos.

L'estudi del FCtR (CD16) ha mostrat que està ancorat a la membrana cel·lular per grups fosfoinositol. Per aquest motiu és lògic que quan s'uneix una substància al CD16 s'observi un augment en el metabolisme fosfoinositol cel·lular (118,120). En conseqüència, el tractament de les dianes amb fosfolipasa específica per metabolisme del fosfatidilinositol condueix a una disminució de la sensibilitat de la diana per la lisi NK (134). No obstant, l'estimulació de l'ANK via el CD16 ha donat resultats dispars que s'han interpretat per l'estimulació de diferents epítops de la molècula o per participar altres determinants antigènics com el CD2 (135-138).

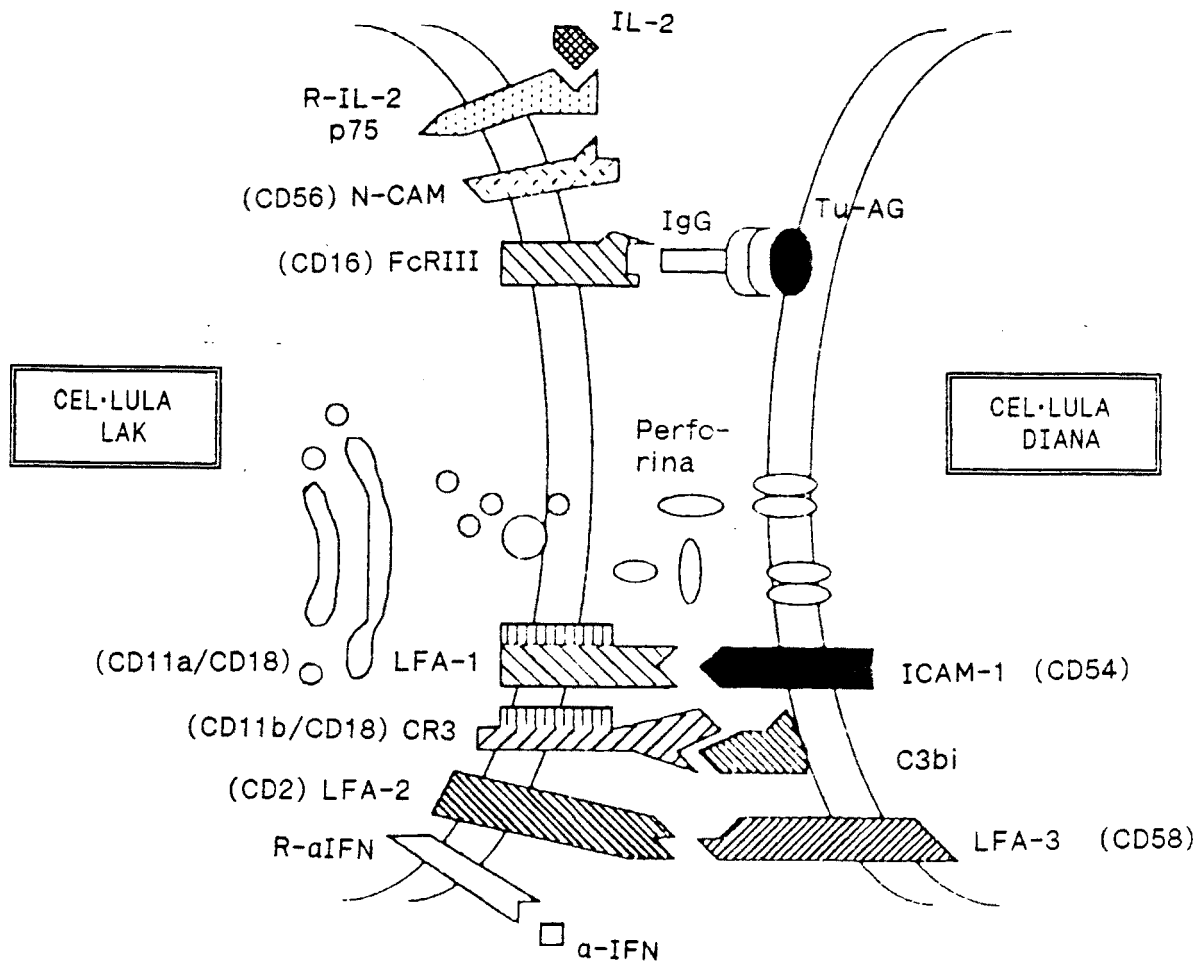
La capacitat de lisi dels LGG abans de l'estímul amb citoquines està directament relacionada amb la quantitat de ARNm que codifica perforina (87). Les substàncies alliberades per l'estimulació de la CNK, com per exemple el NKCF, provoquen la destrucció de membranes liposomals de la diana per digestió dels components lipídics (139).

A més del mecanisme de necrosi cel·lular per abocament de

substàncies citotòxiques, s'ha descrit l'apoptosi de la diana o mort cel·lular programada com un altre mecanisme de lisi utilitzat per les CNK (140). Entre altres fets, està substantat per la presència de desintegració nuclear molt abans que s'observi lesió a la membrana cel·lular, i també, pel fet que el fraccionament en l'ADN de la diana té el patró característic de l'apoptosi.

Figura 3.A.2.2

Molècules de la superfície cel·lular de la CNK i de la cèl·lula diana que participen en la lisi



ICAM = *intercellular adhesion molecule*  
 R-αIFN = receptor per l'α-IFN  
 R-IL-2 = receptor per la IL-2  
 LFA = *leucocyte functional antigen*  
 N-CAM = *neural cellular adhesion molecule*

Lindemann et al (141)



## LES CNK EN SITUACIONS PATOLÒGIQUES

### A. PATOLOGIA NO HEMATOLOGICA

#### 1. Neoplàsies

La CNK és la primera línia defensiva contra el desenvolupament de metàstasis i creixement tumoral, essent un factor pronòstic independent per la supervivència lliure de metàstasi en tumors sòlids (4). L'ANK en malalts cancerosos té, a més a més, valor pronòstic en la predicció de recaiguda i resposta al tractament. Molt abans de la detecció de la metàstasi s'obtenen valors persistentment baixos d'ANK. Per tant, la determinació de l'ANK pot ser important en els estudis i el control dels malalts amb neoplàsia.

S'ha considerat que els tractaments quimioteràpics i ràdio provoquen una disminució de l'ANK, si bé els treballs inicials no inclouen els controls correctes ni el seguiment adequat dels pacients per poder assegurar-ho. Per tant són necessaris estudis controlats per veure l'efecte que el tractament té sobre l'ANK (4).

La introducció de tractaments que inclouen l'administració de CKAL (cèl.lules killer activades per limfoquines) i l'obtenció de remissions amb aquesta terapèutica en malalts que no han respost a altres esquemes posa de manifest la importància de l'ANK en el control de les neoplàsies, i dóna motius per augmentar els coneixements sobre l'efecte que la terapèutica anticancerosa té sobre les CNK.

#### 2. Malalties conductuals.

S'han descrit una sèrie de quadres clínics relacionats amb alteracions de les CNK (4,142-143). El tret anamnètic més característic dels mateixos és astènia, debilitat general i tendència a quadres psiquiàtrics depressius i infeccions víriques. Analíticament, la síndrome de "baixa ANK" (142) té un nombre normal de CNK detectades mitjançant AcMo, però

la citotoxicitat és baixa, mentre que a la síndrome "de fatiga crònica" (143) la disminució d'ANK va lligada a una disminució del nombre de CNK. En població aparentment sana la detecció de forma reiterada d'ANK baixa s'associa amb els trets descrits abans (fatiga, infeccions víriques). Per tant, la determinació de l'ANK en població normal pot detectar una subpoblació amb més risc d'emmalaltir (4).

### 3. Malalties autoimmunes

L'estudi de l'ANK en les diverses collagenopaties i altres malalties de patogènia autòimmune ha mostrat que tenen diversos defectes en la població NK. Per exemple, en el lupus eritematós sistèmic avançat les CNK responen menys a la IL-2, mentre que en la síndrome de Sjögren s'observa una resposta alterada a l' $\alpha$ -IFN (4,144-148).

La diabetis tipus I pot ser causada per diverses infeccions víriques. En la diabetis tipus I existeix una disminució de l'ANK comparada amb el tipus II i la població normal. La disminució de l'ANK sembla estar condicionada de forma genètica, ja que en bessons idèntics que no presenten malaltia existeix també una disminució de l'ANK (4).

### 4. Síndrome de la immunodeficiència adquirida

La infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) provoca un estat d'immunodeficiència al destruir, bàsicament, la població limfocitària CD4<sup>+</sup> i infectar els monòcits. Els malalts de síndrome de la immunodeficiència humana (SIDA) i complex relacionat amb la SIDA tenen disminuïda l'ANK. La disminució de l'ANK és present en malalts amb complex relacionat amb la SIDA o amb SIDA instaurada, mentre que els infectats asimptomàtics tenen una ANK normal (149). La distribució fenotípica dels limfòcits de sang perifèrica mostra una disminució progressiva dels limfòcits CD4<sup>+</sup>, T<sub>ctx</sub> i natural killer (78), així com una important disminució en el nombre de cèl·lules CD57<sup>+</sup> en ganglis d'individus amb complex relacionat amb la SIDA (150). Recentment, s'ha demostrat que la CNK és infectada també pel VIH (80-81).

La causa de la baixa ANK en malalts infectats pel VIH no està completament aclarida, però sembla multifactorial. S'han descrit anomalies en el reciclatge cel·lular (78), alteracions en el citoesquelet, escassa resposta a la IL-2, menor producció d'aquesta citoquina, infecció de les CNK pel VIH i un efecte competitiu entre la gp120 del VIH amb els receptors pel VIP (pèptid intestinal vasoactiu) en els LGG (80-81).

#### 5. Immunodeficiències congènites

Dintre de les immunodeficiències humanes congènites l'espectre de defectes cel·lulars és molt ampli (25). Es poden afectar totes les línies (granulomonocitària, limfòcits B, T i NK), línies aïllades o combinacions d'elles (25,151). El dèficit d'ANK pot acompanyar als limfòcits (B i/o T) (SISC), a la sèrie granulomonocítica (Chediak-Higashi i dèficit de glicoproteïnes) o constituir un defecte aïllat (26).

### B. PATOLOGIA HEMATOLOGICA

#### 1. Aplàsia medul·lar i eritroblastopènia

En una proporció considerable de malalts amb AMG existeix una disminució de l'ANK en el moment del diagnòstic (152-154). El nombre de LGG sembla diferir poc del nombre normal, si bé s'hi observen pocs grànuls. L'estimulació amb IL o IFN provoca un augment en l'ANK. La distribució fenotípica de les CNK mostra una disminució de la fracció CD16<sup>+</sup>. La recuperació hematopoètica després del tractament amb globulina antitímocítica (ATG) s'acompanyava de la recuperació de l'ANK (152). No s'ha trobat cap factor sèric que inhibeixi l'ANK en aquests malalts (152-153).

L'estudi de l'ANK entre els membres d'una família afecta d'aplàsia de Fanconi va mostrar una reducció en l'ANK en la majoria dels membres, presentant algun d'ells alteracions en la resposta a la IL-2 i l'IFN, postulant que la baixa ANK pot ser un defecte intrínsec de la malaltia (155).

L'eritroblastopènia adquirida és una entitat poc freqüent en la que es creu participen mecanismes autoimmunes. Està descrit un cas d'eritroblastopènia adquirida amb una elevada proporció de LGG, citotoxicitat elevada i inhibició selectiva de la formació BFU-E i CFU-E en mostres allogèniques per part dels LGG de la malalta (156).

## 2. Síndromes mielodisplàsiques

L'ANK en pacients afectes de quadres mielodisplàsics està disminuïda respecte de la població normal sense que la disminució s'hagi associat amb cap característica de la malaltia ni forma evolutiva (157). L'estímul amb interferó no normalitza l'ANK (158).

## 3. Leucèmia aguda (LA) i leucèmia mieloide crònica (LMC)

La determinació de l'ANK en el moment del diagnòstic d'una LA mostra valors molt baixos (153-154). La remissió de la malaltia provoca l'augment i normalització de l'ANK, que s'altera de nou quan té lloc una recaiguda (153). Sorskaar *et al* (159) constaten una normalització de l'ANK després del primer mes de remissió completa (RC), mentre que en estudis previs de Matera *et al* (160) realitzats en un grup de pacients amb LA, l'ANK només era normal en dos malalts amb una RC molt llarga. Els nens amb LAL presenten unes xifres de limfòcits CD16<sup>+</sup> i CD57<sup>+</sup> normals durant el tractament de manteniment encara que l'ANK és inferior a la dels nens fora de tractament (161). L'ANK obtinguda de MO en nens amb RC prolongada és superior a la dels nens control, així com també és més elevada la proporció de limfòcits CD16<sup>+</sup> i CD57<sup>+</sup> (159). L'estimulació amb IFN augmenta o normalitza l'ANK dels pacients amb LAL (159,161).

A la LMC l'ANK també es troba disminuïda (154,162-163). Aquesta disminució es troba en totes les fases evolutives de la malaltia (163). En fase crònica existeix un nombre normal de limfòcits CD16<sup>+</sup>, existint per tant un defecte intrínsec de les CNK. En la fase d'acceleració i crisi blàstica la disminució de l'ANK pot estar influïda per la presència de blasts entre les cèl·lules efectores. L'estudi de la població NK en individus amb LMC tractats amb IFN no han permès relacionar l'efecte

beneficis d'aquest fàrmac amb una millora en la funció NK (162).

#### 4. Transplantament de moll d'os

Les CNK són les primeres que es recuperen en el moll després d'un TMO (164), i la seva recuperació sembla necessària per l'empelt de la medulla infosa. Les CNK semblen contribuir a la síntesi d'immunoglobulines, de factors afavoridors del creixement i diferenciació de cèl·lules hemopoètiques i contribuir a l'eliminació de cèl·lules infectades per virus (4). Un nivell elevat de citotoxicitat en el període immediat post-TMO s'ha relacionat amb una menor freqüència d'infeccions per CMV i una millor superació de les mateixes (165). En els TMO realitzats per processos neoplàstics, l'efecte antileucèmic està mediat per les CNK (4,166-167). La relació entre la MECH i l'ANK és controvertida: en uns estudis no es troba cap relació (153), mentre que en altres es troba relació entre els nivells elevats d'ANK en el post-TMO i la presència de MECH (103-104).

#### 5. Malaltia de Hodgkin (MH) i limfomes no Hodgkin (LNH)

L'ANK en el moment del diagnòstic de malaltia de Hodgkin i a l'inici del tractament és baixa (168-169). L'ANK va augmentant amb el tractament fins normalitzar-se quan s'assoleix la RC, mentre que en els pacients que no responen al tractament l'ANK va davallant (169). El defecte en l'ANK sembla més greu en estadis avançats (III i IV) respecte d'estadis inicials de la malaltia, i en els pacients que tenen símptomes B (170). L'estimulació amb IFN normalitza l'ANK d'aquests malalts (170). La xifra de CNK, identificades pel CD11b, està disminuïda en els pacients amb malaltia de Hodgkin (171). A nivell esplènic, l'ANK de les melses afectades pel limfoma és més elevada que la de melses no infiltrades (172), i aquestes són més citotòxiques que les melses extretes per traumatisme (173). Comparativament, els nivells de citotoxicitat de melses infiltrades per MH són més elevats que en les infiltrades per LNH (172). Aquestes troballes no tenen una explicació evident.

Els pacients amb LNH tenen una ANK disminuïda en el moment del diagnòstic que es normalitza en la RC (4,168). De forma paral·lela, la xifra de cèl·lules CD56<sup>+</sup> a la SP en situacions de malaltia activa és baixa i es normalitza a l'obtenir la RC. A més, una reducció important en el nombre de limfòcits CD56<sup>+</sup> precedeix la recaiguda limfomatososa (174). Els estudis immunoarquitecturals dels ganglis afectats per LNH han mostrat una relació entre el percentatge de cèl·lules amb marcadors de proliferació (CD71, CD38) i la infiltració per limfòcits CD57<sup>+</sup> en LNH de baix grau i de grau intermig. La relació es perd en LNH d'alt grau (175-176). Els LGG dels pacients lisen les cèl·lules tumorals autòlogues, mentre que la CMN és incapaç d'aquesta funció. Aquesta diferència sembla deguda a l'efecte inhibidor dels monòcits en l'acció de les CNK (177).

#### 6. Síndromes limfoproliferatives cròniques de línia B

En aquest apartat no farem referència a la LLC-B, que s'exposarà més llargament en un altre apartat. La majoria d'estudis sobre les CNK s'han realitzat a la tricoleucèmia. L'ANK a SP dels malalts amb tricoleucèmia està disminuïda (34,178-180). El motiu pel qual està reduïda l'ANK a la tricoleucèmia no és clar. Uns autors involucren la disminució de la unió amb la cèl·lula diana (178); altres creuen que és secundari a una disminució en el nombre de CNK (34,180) i uns darrers pensen que existeix un defecte intrínsec en les CNK dels pacients amb tricoleucèmia (181). L'ANK es restaura de forma parcial amb la incubació amb IFN (178-179). Fenotípicament, la proporció de limfòcits CD57<sup>+</sup> entre els limfòcits no-B és més elevada que en controls, mentre que els CD16<sup>+</sup> estan lleugerament disminuïts (178). L'alteració en l'ANK és més evident en pacients amb una elevada proporció de tricoleucòcits a SP (179), i s'ha descrit correlació entre l'estabilitat de la malaltia i els nivells d'ANK (182). Els tricoleucòcits són insensibles a l'acció de les CNK i de les cèl·lules LAK i, per tant, és difícil atribuir el benefici obtingut amb el tractament amb IFN per la millora en l'ANK que provoca (179,183-185).

## 7. Síndromes limfoproliferatives T i NK

### a. Leucèmies agudes

En els últims anys s'han descrit diverses LAL amb característiques morfològiques, fenotípiques i, en ocasions, funcionals que corresponen a CNK (186-189). La freqüència de LAL amb marcadors NK o amb ANK oscil·la entre el 10 % i el 14 % (187-188). La presència de trets NK s'ha associat amb característiques de pitjor pronòstic (major edat, leucocitosi i infiltració leucèmica) (188). No obstant, les sèries són curtes i no existeixen prou dades que permetin definir característiques clíniques o evolutives diferencials en aquestes "LAL-NK".

### b. Leucèmies cròniques

Dintre dels processos limfoproliferatius crònics existeixen aquells derivats de la proliferació de LGG (29,190-195). Clínicament es caracteritzen per la presència de graus diversos de limfocitosi crònica, granulopènia, anèmia i augment dels LGG a SP. Els malalts poden presentar altres símptomes com eritroblastopènia, neutropènia crònica, neutropènia cíclica i artritis reumatoide (190-191). No existeixen uns criteris diagnòstics concrets, però la presència de símptomes o signes de la malaltia amb recomptes de LGG superiors a  $1 \times 10^9/L$  -  $2 \times 10^9/L$  de forma persistent durant 3 - 6 mesos permet el diagnòstic de la mateixa (190-191). De les descripcions d'aquest procés patològic es poden delimitar dos grans subgrups de proliferacions de LGG: un grup  $CD3^+$  amb reordenament del RCT que correspondria a les proliferacions de limfòcits  $T_{ctx}$  i un grup  $CD3^-$  amb el RCT en línia germinal que correspondria a limfòcits NK (29,190,193). Estan descrits casos amb comportament agressiu o aguditzacions fulminants de processos crònics de LGG (21,57,196-198). Dels escassos treballs sobre aquesta patologia s'ha descrit l'associació del quadre amb d'altres proliferacions malignes (199), la producció de NKCF que explicaria l'ANK que expressen (85) i la presència de disfunció dels limfòcits B amb fenòmens autoimmunes (200).

## METODES DE DETECCIO DE CNK

L'estudi de les CNK s'ha d'orientar cap a la **quantificació** del nombre de cèl·lules per mitjà d'AcMo anti-NK i la **determinació de l'ANK** que produeixen, ja que l'existència d'un nombre normal de CNK detectades per morfologia o antígens de superfície no té relació directa amb la citotoxicitat que poden desenvolupar (4).

### 1. Morfologia òptica i ultraestructural.

Les CNK estan integrades sota la morfologia de LGG i més del 95 % dels LGG són CNK. Per tant el recompte dels LGG en extensions de sang perifèrica dóna una primera idea del nombre de CNK presents. La morfologia dels LGG sembla conservar-se millor en extensions o citocentrífugues de sang total que en SCM (33).

A nivell ultraestructural es pot valorar la presència de CNK per la troballa de limfòcits granulats, amb activitat superficial moderada i la presència de *PTA*.

### 2. Citoquímica i immunofluorescència.

Les cèl·lules amb ANK presenten de forma constant tinció amb quinacrina que pot emprar-se per la detecció d'aquest tipus cel·lular (201). L'expressió a la superfície cel·lular d'Ag específics permet quantificar el nombre de CNK d'una mostra, si bé la millor manera de definir la població NK és l'immunomarcant múltiple (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) (31).

### 3. Assaig de citotoxicitat.

a. Metodologia. De forma majoritària **s'utilitza l'assaig a 4 hores** front la línia cel·lular K562. No obstant **l'assaig es pot realitzar a temps més prolongats de contacte diana-efectora (en general entre 18 i 20 hores d'incubació)** i utilitzar altres línies cel·lulars diana



(Raji, Daudi, Molt4, etc.). Els resultats de citotoxicitat obtinguts canviaran depenent de la durada de l'assaig i de la diana emprada.

El període d'incubació pot influir de forma important en els resultats. L'ANK es manté relativament constant en individus sans (4). La variació en la citotoxicitat obtinguda del mateix individu en dies subsegüents és àmplia quan es realitzen incubacions de 4 ó 8 hores, mentre que la diferència és mínima entre els resultats dels assaigs en incubacions de 16 hores (202). A més, estudis seqüencials d'ANK en individus sans han permès definir tres comportaments de citotoxicitat: un primer grup que exerceix una lisi elevada a les 4 hores d'incubació, un segon grup amb ANK moderada a les 4 hores i un tercer grup amb ANK baixa a les 4 hores, però comparable a la del primer grup a les 16 hores d'incubació (202). Les diferències en la citotoxicitat entre els dos períodes d'incubació són degudes, amb tota probabilitat, a que a les 4 hores no tothom ha pogut reciclar les CNK per lisar noves dianes (202).

S'han descrit mètodes per determinar la citotoxicitat sense utilitzar isòtops radioactius. S'utilitza una substància fluorescent i es valora l'ANK per anàlisi en un citofluoròmetre. La substància utilitzada s'incorpora al citoplasma de la cèl·lula on el metabolisme cel·lular la converteix en fluorescent. La població lisada perd la fluorescència i es calcula la cel·lularitat viable segons la fluorescència que queda (203).

#### b. Estandarització.

i) Línia diana: L'ANK que efectua una població efectora depèn del temps de cultiu de la línia diana. La citotoxicitat exercida contra línies cultivades durant 4 dies és superior que la obtinguda en cultivades tres dies i aquesta sobre la de dos dies de cultiu (202).

ii) Proporció diana:efectora (D:E): La citotoxicitat experimental varia segons la proporció diana efectora utilitzada. La citotoxicitat augmenta quan el nombre de CNK per cada diana augmenta. No

obstant, la citotoxicitat té un màxim a partir del qual no es modificarà a l'incrementar el nombre de CNK. L'ANK es realitza amb diverses proporcions ascendents de D:E i s'obté una corba de citotoxicitat. En les proporcions més petites l'increment de la citotoxicitat és més gran que en proporcions superiors. Zaretskaya *et al* (202) demostren que la proporció 50:1 està col·locada en la zona ascendent de la corba i, que per tant, l'ANK obtinguda pot modificar-se més fàcilment que en proporcions D:E majors (202) (figura 3.A.4.1).

iii) Controls. La validesa de cada assaig individual ha de valorar-se front a un resultat control. Els LSP d'un individu normal, preferiblement amb ANK coneguda, són un control vàlid. L'ANK de cada individu tendeix a mantenir-se constant amb el pas del temps i, per tant, ens permetrà controlar la qualitat de l'assaig (4,204). També es pot utilitzar LSP amb ANK coneguda criopreservats i descongelats com a mínim 5 hores abans del seu ús (4,204). El valor de citotoxicitat de o dels controls ha d'estar dintre dels valors normals per acceptar com vàlid el resultat de l'estudi.

iv) Càlcul de la citotoxicitat experimental. La fórmula de càlcul més emprada per determinar la citotoxicitat d'una mostra és la següent:

$$\text{citotoxicitat (\%)} = \frac{\text{Experimental} - \text{Espontània}}{\text{Màxima} - \text{Espontània}} \times 100$$

No obstant s'utilitzen altres fórmules de càlcul similars (202).

v) Unitats lítiques. Els valors experimentals obtinguts poden ser transformats en unitats independents de la proporció D:E per ajustament dels valors experimentals de les diverses proporcions a corbes teòriques per mètodes de regressió lineals, no lineals o *plotting* (113,204-206), o bé calculant l'ANK per mL de SP (154). No existeix una unitat d'expressió acceptada per tothom ni es poden

comparar els resultats obtinguts en diferents institucions sent a vegades difícil valorar resultats seqüencials d'un mateix pacient (204). Per aquest motiu s'ha intentat trobar una forma d'expressió de l'activitat lítica que sigui proporcional a l'activitat efectora (204).

#### c. Mostra biològica.

L'ANK canviarà segons la procedència de la mostra. Com s'ha exposat en apartats previs, la SP té nivells elevats de citotoxicitat mentre que mostres de MO desenvolupen una citotoxicitat nul·la.

Tampoc obtindrem la mateixa ANK quan utilitzem poblacions de LGG més o menys purificades. La citotoxicitat d'un mateix individu es veu reflectida de forma diferent en cada població segons el mètode de separació utilitzat (leucòcits totals, LSP, limfòcits E<sup>+</sup>, o altres poblacions purificades) (25,206-209). Per exemple, la població E<sup>+</sup> conté aproximadament la meitat de l'ANK (210). La comparació entre ANK d'individus diferents s'haurà de fer emprant el mateix mètode de separació.

La incubació de la població efectora amb potenciadors, inhibidors o AcMo pot modificar la citotoxicitat obtinguda, tal com s'ha mencionat en apartats anteriors.

#### 4. Assaig d'unió a diana

Abans de produir-se la lisi de la cèl·lula diana ha de produir-se la unió entre la cèl·lula diana i l'efectora. Per analitzar la capacitat d'unió de la cel·lularitat efectora s'han descrit diversos sistemes (34,37,158,171,178,211) que presenten petites diferències tècniques. Es barreja la línia diana amb la cel·lularitat efectora a proporcions D:E baixes, generalment 1:1, se centrifugen per afavorir el contacte i s'incuben per un període variable (de 3 minuts a 30). Finalment, es resuspèn amb molta cura el botó cel·lular i es compta el percentatge de limfòcits units a dianes.

## LES CNK I GRUPS CEL·LULARS RELACIONATS

Les CNK s'han relacionat amb altres poblacions cel·lulars per la seva morfologia, tipus de mecanisme de lisi i activitat enfront de cèl·lules diana. Les cèl·lules relacionades són els limfòcits  $T_{ctx}$ , les cèl·lules LAK i limfòcits T amb morfologia LGG (27,31,46,141,212-216).

Els limfòcits  $T_{ctx}$  comparteixen amb els limfòcits NK la morfologia de LGG i la lisi sense relació amb molècules del SMH (31,213,215). Aquests limfòcits T poden desenvolupar ANK-like després de l'estimulació amb IL. De forma diferencial expressen CD3 i tenen reordenats els gens  $\alpha/\beta$  o  $\tau/\delta$  del RCT (135). En aquest subgrup T també es detecta l'Ag CD56 amb presència o no d'Ag CD16 (31). No obstant, els limfòcits  $T_{ctx}$  desenvolupen la citotoxicitat per mitjà del complex CD3/RCT (31,135). Aquest grup cel·lular comprèn un 5% dels LGG (31). L'eficàcia en la lisi és menor que la dels limfòcits NK i, juntament amb el menor nombre, són la població menys important en l'ANK (217). Els limfòcits  $T_{ctx}$  poden lisar la línia diana K562, es potencien per l'addició d'IL al medi, però ni en aquesta última situació, poden lisar línies de tumors sòlids NK-sensibles (217).

En SP es poden definir 3 poblacions respecte de l'expressió de CD16 i CD56:  $CD3^-CD56^+CD16^+$ ,  $CD3^+CD56^+CD16^-$  i  $CD3^-CD56^+(intens)CD16^-$ . Les dues primeres poblacions contenen LGG predominant la primera de les dues, que és la més efectiva en la lisi. L'última població (<2% LSP) comprèn limfòcits grans tant granulats com agranulats, i és capaç d'exercir citotoxicitat no restringida al SMH. La seva relació amb els dos tipus cel·lulars anteriors és desconeguda (218).

Les cèl·lules activades per limfoquines (LAK) produeixen, per definició, lisi després de l'estimulació amb limfoquines. L'espectre de dianes de CNK estimulades i CLAK és molt similar (31). L'activitat LAK està mediada tant per limfòcits  $CD3^+$  com  $CD3^-$ , si bé majoritàriament per la població  $CD3^-$  que expressa CD16 i CD56 (31,46,141). El precursor de les CLAK no és un sol tipus de limfòcit. Els limfòcits  $CD3^-$  arriben a la màxima estimulació a les 24 hores d'incubació, mentre que la població  $CD3^+$  arriba

al màxim a les 48-72 hores d'estimulació amb IL-2 (31). Si la majoria de la població que provoca l'activitat LAK és la població NK, quins són els mecanismes moleculars responsables de l'augment de capacitat lítica?. D'una banda, les poblacions de LGL purificades mitjançant gradients de Percoll tenen un espectre més ampli de línies diana que la separació de CMN de SP i, d'altra banda, la citotoxicitat trobada en assaigs de 18 hores és més semblant a l'activitat LAK, fonamentant el fet que l'activitat LAK és deguda a poblacions NK altament activades (46).

Finalment, dintre dels LGG existeix una proporció petita que expressa el CD4 i el CD11b (<2 % dels LSP). En el 70 % - 80 % d'ells expressen CD57, no poseeixen CD16 ni exerceixen citotoxicitat de forma espontània contra la línia K562. No obstant, després de l'estimulació amb IL-2 són capaces de produir citotoxicitat (214). La seva funció en el sistema immune i la relació amb altres tipus cel·lulars és desconeguda.

## LEUCEMIA LIMFÀTICA CRÒNICA DE LÍNIA B

La LLC és un procés limfoproliferatiu de tipus clonal. És el tipus de leucèmia més comú entre els caucàsians (219-221), disminuint la seva incidència entre hispànics i presentant-se de forma rara entre asiàtics. La malaltia predomina en persones de sexe masculí i afecta sobretot a individus de més de 50 anys, però pot desenvolupar-se a qualsevulla edat (219-220). La LLC és una hemopatia caracteritzada per l'acumulació i proliferació de limfòcits d'aparença madura, però immunològicament no plenament competents (219-220). A la majoria dels casos prolifera una clona de limfòcits B i, amb molta menor freqüència, limfòcits T. L'evolució de la malaltia ve donada per l'acumulació d'aquests limfòcits i per l'afectació de diferents òrgans (219-220). La clonalitat pot ser demostrada per estudis citogenètics, per l'expressió d'un sol tipus de cadena lleugera, per l'anàlisi del patró de reordenament dels gens de les immunoglobulines i l'estudi dels isoenzims de la G6PD (219).

### Etiopatogènia

La causa de la LLC no és coneguda (219-220,222). No s'ha relacionat la malaltia amb radiacions ionitzants ni amb contacte amb fàrmacs o agents químics (223-225).

A la patogènia de la LLC-B s'ha mencionat també l'existència de factors hereditaris predisposants. Dóna suport a aquesta hipòtesi la baixa incidència de la malaltia entre la població japonesa (221). A més, no és infreqüent l'aparició de LLC-B en diversos membres de la mateixa família. En aquests nuclis familiars hi ha més incidència de leucèmies i limfomes (221). Els individus aparentment sans de famílies amb més d'un membre amb LLC-B presenten diverses alteracions en la funció dels limfòcits B (226). Ademés existeix major freqüència de malalties immunològiques en els parents així com més predisposició a neoplàsies de ronyó i pell i, en contrapartida, menys casos de fenòmens al·lèrgics entre malalts amb LLC-B (159). Per tant sembla que a la LLC-B existeixen unes característiques genètiques que afavoreixen l'aparició de certes malalties, entre elles la

LLC-B. No obstant, en estudis cas-control que inclouen més de 672 malalts de LLC-B la majoria dels casos es consideren d'aparició esporàdica (221).

Els retrovirus són una causa comuna de leucèmia en animals i és l'agent implicat en el desenvolupament de la leucèmia limfoma T de l'adult (LLTA) (219). La LLTA és causada per un retrovirus (HTLV-1) que codifica una proteïna capaç d'estimular altres gens cel·lulars. L'HTLV-1 també s'ha relacionat amb la limfocitosi T persistent i la leucèmia crònica T. L'HTLV-2 s'ha relacionat amb algun cas de leucèmia crònica T (219) i tricoleucèmia T (227). A la LLC-B la participació de virus no és tan clara. El 1981 Gathings *et al* van descriure l'aïllament de partícules retrovirals en cultius de limfòcits provinents de malalts amb LLC-B (228). Aquestes partícules virals es van relacionar amb l'HTLV-1 per reactivitat creuada amb anticossos contra aquest virus, però aquest fet encara no s'ha confirmat (219). Els retrovirus modifiquen la dinàmica cel·lular quan es fusiona l'ADN viral amb el cel·lular, alteren l'estructura o l'organització de l'ADN o bé afavoreixen l'expressió d'algun oncogen (227). A la LLC-B es detecta reordenament d'oncogens amb molt poca freqüència. En processos relacionats s'han observat reordenament d'oncogens com el *bcl-1* entre la regió d'unió de la cadena pesada de la immunoglobulina detectat en la translocació t(11;14)(q13;q23) de la leucèmia prolimfocítica crònica B (LPC-B) o el reordenament de l'oncogen *Hu-ets-1* en un limfoma de cèl·lula petita (227). El paper de virus ADN (virus d'Epstein-Barr, citomegalovirus) en l'etiopatogènia de la LLC és desconegut. Si bé s'ha relacionat la infecció per virus d'Epstein-Barr amb tumors en animals, no sembla jugar cap paper en el desenvolupament de la LLC-B.

La dificultat en obtenir metafases en els limfòcits de la LLC-B ha dificultat el coneixement de les alteracions citogenètiques de la malaltia. La incorporació de mitògens ha millorat la qualitat del material a estudi. S'observen alteracions citogenètiques clonals en més del **50% dels malalts** (219,229-230). La majoria afecten el cromosoma 12, 13 i 14. **La trisomia 12 és l'alteració més freqüent en la majoria d'estudis (118,219,229-231), si bé en algun d'ells l'anomalia més freqüent implica el cromosoma 14 (14q+) (232).** La trisomia 12 pot veure's aïllada o acompanyada d'altres anomalies

citogenètiques (229-230,233-234). L'alteració més freqüent en el cromosoma 13 és la delecció intersticial que afecta la banda 13q14, lloc on se situa l'anti-oncogen del retinoblastoma (230). Altres alteracions citogenètiques descrites són translocació entre els cromosomes 11 i 14 [t(11q;14q)], inversions i deleccions del cromosoma 14, deleccions del 6 (6q-) (231), reordenaments del 17 i 18, delecció o translocació compensada del 9 (234-235) i diverses alteracions menys freqüents que impliquen altres cromosomes. És interessant el fet que en alguns estudis els malalts sense alteració citogenètica no desenvolupen alteracions posteriorment, mentre que els malalts amb anomalies en van adquirint de noves amb l'evolució de la malaltia (219).

A nivell del cromosoma 12 s'han identificat els oncogens *Ki-ras-2* i *int-1*, però no s'ha pogut demostrar que s'alterin en la trisomia 12 (233). La translocació de material genètic entre els braços curts dels cromosomes 11 i 14 (t11;14)(q13;q32) afecta l'oncogen *bcl-1* (11q13), i les anomalies que involucren el cromosoma 18 poden afectar l'oncogen *bcl-2* localitzat a la banda 18q22 (233). La proximitat entre el gen de la cadena pesada de la Ig i l'oncogen *bcl-1* que succeeix amb la t(11;14) afavoreix la hipòtesi etiopatogènica de la disregulació cel·lular (219). No sols el cromosoma 14 presenta relació amb la síntesi de les immuglobulines sinó que altres cromosomes alterats de forma freqüent a la LLC-B hi tenen relació. El cromosoma 2 conté el gen de la cadena lleugera *kappa*, el 22 de la cadena lleugera *lambda*. Altres alteracions cromosòmiques poden afectar a oncogens com el *c-myc* i *c-mos* al cromosoma 8, el *c-Ras-Kirsten* al cromosoma 11 o el *c-ras-Harvey* al cromosoma 12 (219).

La leucemogènesi és un procés escalonat. Partint d'una fase "preleucèmica" es desenvolupa una leucèmia després d'afegir-se noves lesions externes. Aquest fet és molt evident a la LMC. La LLC-B és un procés clonal demostrat per les troballes abans mencionades. No obstant, és més difícil saber si el creixement de la població és regulat pels mecanismes normals o no. Els limfòcits tenen una vida llarga, i la presència d'un nombre augmentat de limfòcits pot reflectir un increment del nombre de progenitors clonals més que un creixement autònom de les cèl·lules. Tampoc se sap de forma segura si el limfòcit de la LLC-B és una



subpoblació diferenciada o bé l'expressió d'una població immadura, rara en el desenvolupament B normal. La capacitat que té el limfòcit de la LLC-B per madurar fins a cèl·lula plasmàtica després de ser estimulada *in vitro* sembla indicar que existeix una dificultat en la maduració. Per tant, la LLC-B podria considerar-se com un estat preleucèmic que només en certs casos es transforma en una leucèmia. L'edat avançada dels pacients conduiria a la mort abans que el procés es pogués leucemitzar. La progressió de la malaltia cap a formes més agressives està associada a un increment en les anomalies citogenètiques, de forma similar al que succeix en la LMC. Per tant, certs factors mutagènics són necessaris per una expressió de malignitat plena a la LLC-B (222).

## ASPECTES CLINICS I IMMUNOLÒGICS DE LA LLC-B

### 1. Incidència

La LLC-B representa l'u per cent de les neoplàsies i al voltant del 25 % de les hemopaties malignes. La incidència anual se situa prop dels 3 casos per 100.000 habitants (220,236-237).

La LLC-B afecta sobretot a gent d'edat avançada. Es la leucèmia més comuna en persones de més de 50 anys (219,221,236-237). La mediana d'edat se situa en els 60 anys (220), si bé al voltant del 25 % dels pacients tenen una edat inferior als 60 anys (221). La distribució per sexes mostra un predomini del sexe masculí (1,5-2:1) (220-221). No hi ha diferències d'incidència entre blancs i negres (220).

La distribució mundial de la malaltia no és homogènia. Representa quasi el 40 % de les leucèmies de Dinamarca i només el 2,5 % de les del Japó. A les nacions occidentals la LLC és rara en individus d'edat inferior als 30 anys, amb un increment geomètric amb l'edat. A l'Àfrica occidental existeix una distribució bimodal de la incidència. El primer pic se situa entre els 40 i 44 anys i afecta de forma predominant a dones, i el segon pic se situa per sobre dels 70 anys i incideix sobretot entre homes (221).

### 2. Clínica

La forma de presentació de la LLC-B és molt heterogènia. Prop d'un 25 % dels casos són asimptomàtics i el diagnòstic es fa de forma casual (238). La resta de malalts presenta una clínica insidiosa d'astènia, adenomegàlies o infeccions. De forma menys freqüent la simptomatologia inicial és diàtesi hemorràgica o infiltració leucèmica (220).

L'exploració física pot ser normal, si bé en més del 50 % dels malalts es troben adenomegàlies (239). Es poden afectar totes les regions ganglionars, però de forma preferent ho fan les laterocervicals i

supraclaviculars. Es pot palpar esplenomegàlia en un nombre no despreciable de malalts i, de forma menys freqüent, hepatomegàlia.

El diagnòstic es basa en les alteracions de la sang **perifèrica** i moll de l'os. La leucocitosi amb limfocitosi absoluta és la **trobada** més característica. La limfocitosi és variable ( $15 \times 10^9/L - 150 \times 10^9/L$ ). L'examen morfològic de SP mostra limfòcits de tamany petit, nucli rodó sense nuclèols amb cromatina condensada formant grumolls. El citoplasma és molt escàs, proporcionant una relació nucli/citoplasma elevada. És molt característica la presència d'ombres nuclears produïdes al trencar-se els limfòcits anormalment fràgils d'aquesta entitat. Entre aquests limfòcits podem trobar limfòcits més grans, centròcits, centroblasts, prolimfòcits o limfòcits d'aspecte estimulat en una proporció baixa (240). Percentualment hi ha una disminució dels neutròfils conservant-se el nombre absolut dels mateixos. L'anèmia s'observa en un 15 % - 30 % dels malalts, generalment normocròmica normocítica, però quan l'anèmia és de mecanisme immune poden trobar-se esferòcits i policromàsia. La plaquetopènia és menys freqüent (236-237).

La hipogammaglobulinèmia està present en un 10-70 % dels pacients (219-220, 241-242). El descens pot observar-se en totes les Ig o només afectar algun tipus (242). Per electroforesi es pot detectar la presència de component monoclonal en el 5 % dels malalts, però per tècniques d'electroforesi/immuno-fixació es pot detectar en un 25 - 50 % dels pacients (219). Generalment és de tipus IgM i té les mateixes característiques que la Ig que expressen els limfòcits de la LLC-B.

Els ganglis presenten una infiltració difusa per limfòcits ben diferenciats amb algunes cèl·lules més grans (prolimfòcits, immunoblasts) que poden formar nius proliferatius (patró pseudofolicular) o constituir àmplies zones del gangli (patró tumoral) (243-244).

La cel·lularitat del mielograma està constituïda per **una infiltració** variable de limfòcits amb les mateixes característiques **que s'observen** a la perifèria. Generalment la infiltració és superior al 40 % de la cel·lularitat medullar. L'estudi citoquímic de la LLC-B mostra una

disminució de la fosfatasa àcida i beta-glucoronidasa (245).

La biòpsia de moll d'os pot presentar diversos patrons d'afectació per la malaltia i, a la literatura, es descriuen múltiples sistemes de classificació histològica de la infiltració (246-256). Des de classificacions que distingeixen 2 tipus de patró (nodular o difús) (247-248), 3 tipus de patró: difús, nodular i mixte (250); intersticial, nodular i empaquetat (246); difús, nodular i parcial (249), 4 tipus d'afectació histològica amb infiltració intersticial, nodular, difusa i mixte (251-253), si bé el patró mixte en la classificació de Rywlin és la combinació de nodular i difús mentre que en la classificació d'Hernández Nieto *et al* (taula 3.B.2.1) el patró mixte és la combinació del nodular i intersticial. Altres grups han descrit 5 patrons d'afectació (intersticial, nodular, difús i 2 mixtes que inclouen els patrons mixtes descrits per Rywlin i Hernández Nieto *et al*) (254,256).

### 3. Immunologia

L'estudi immunològic a la LLC-B comprèn tant estudis funcionals dels limfòcits B, T i NK com l'anàlisi del fenotipus dels mateixos. Aquests estudis han millorat el coneixement dels fenòmens clínics i analítics que presenta aquesta entitat.

#### a. Limfòcits B

El limfòcit B de la LLC-B expressa una escassa quantitat d'Ig a la seva superfície (219-220,257-258). Generalment expressa cadenes  $\mu$ ,  $\mu\delta$  i, amb menys freqüència, cadenes  $\alpha$ ,  $\tau$  o no n'expressa cap (258-260). L'expressió de cadenes lleugeres està limitada a un sol tipus predominant les LLC-B *kappa* (63%) sobre les *lambda* (30%) o negatives (7%) (258,260). En la majoria de casos es poden detectar Ig en el citoplasma cel·lular (261-262).

Els limfòcits de la LLC-B presenten diversos Ag de línia B (CD19, CD20, CD21, CD24) (257,259). La positivitat pel CD22 és més variable (257,263). Tenen antígens del sistema HLA-DR i receptors per

C3 i la porció Fc de la IgG. Característicament formen rosetes amb hematies de ratolí i expressen l'Ag CD5 que també és positiu en els limfòcits T madurs (257,260,264-265). Si bé el fenotipus és molt heterogeni per la resta de grups de diferenciació, altres marcadors d'interès són positivitat pel CD23 i la negativitat pel CD25, CD11c, CD38, CD10 i FMC7 (257,265-266). Alguns casos de LLC-B expressen epítops del grup CD1 (263,267). De forma excepcional s'han descrit dos casos de LLC-B amb expressió de CD3 (pan-T) (268).

En individus sans s'ha identificat una petita proporció de limfòcits B de SP (5-10%), amígdala i centre germinal i zona del mantel en el fol·licul ganglionar amb un fenotipus molt semblant al del limfòcit de la LLC-B (rosetes M, CD5<sup>+</sup>, IgS dèbil)(265-266,269). Aquest fenotipus és majoritari durant la vida fetal. Els limfòcits extrets de cordó umbilical expressen un fenotipus  $\mu^+\delta^+\alpha^- \tau^-$  CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, mentre que el percentatge d'expressió del CD23 oscil·la entre el 20 i el 30 %. L'índex de proliferació dels limfòcits de cordó (Ki67 = 11±4%) és més elevat que els limfòcits de la LLC-B (270). Per tant, és possible que la LLC-B correspongui a una expansió d'aquesta particular població B.

Els limfòcits de la LLC-B tenen escassa o nul·la capacitat d'estimular-se en cultius autòlegs o al·logènics (220). S'ha descrit una motilitat de superfície anòmala, una disminució en la resposta a estímuls mitogènics com el virus d'Epstein-Barr o els lipopolisacàrids i alteracions en la citotoxicitat cel·lular per anticossos (220). La resposta antigènica després de vacunació està disminuïda (271).

## b. Limfòcits T

Els limfòcits T dels malalts amb LLC-B presenten també una sèrie d'anomalies respecte dels individus sans. Percentualment estan disminuïts, però el nombre absolut és superior al normal (220,272-273). L'increment dels limfòcits T és probablement policlonal. La distribució entre limfòcits CD4 i CD8 a SP està alterada, ja que

L'increment de limfòcits CD8 és més acusat que el de CD4 i, en fases finals de la malaltia disminueix el nombre absolut de CD4 (220,273-275). La subpoblació CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> (inductora de la col·laboració) està augmentada, mentre que la subpoblació CD4<sup>+</sup>CD45R<sup>+</sup> (inductora de la supressió) està normal en estadis precoços de la malaltia i disminuïda en estadis avançats (273). No obstant, Briggs *et al* (276) descriuen un increment en la població CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>. La distribució dels limfòcits CD8 és normal per Vuiller *et al* (273), mentre que Terstappen *et al* troben un augment en la població CD8 citotòxica (275).

La funció dels limfòcits T mostra anomalies, si bé els resultats son contradictoris. La resposta mitogènica a les lectines generalment és normal (220). La literatura aporta dades a favor d'augmentos (277) o disminucions (278-281) de la funció col·laboradora i augmentos (281-282) o disminucions de la funció supressora (283-284). En conjunt, funcionalment i fenotípica, sembla existir un augment de la funció supressora junt amb disminució de la col·laboradora (281).

L'anàlisi de la població T en seccions histològiques de moll d'os de pacients amb LLC-B mostra una escassa infiltració per limfòcits T i una distribució anòmala de les poblacions CD4 i CD8. En biòpsies medul·lars normals el nombre de limfòcits CD8 supera als CD4, mentre que a la LLC-B el patró és l'invers (285).

### c. Limfòcits NK

El funcionalisme i el fenotipus d'aquesta població cel·lular en malalts amb LLC-B s'exposarà més tard.

### d. Hipogammaglobulinèmia

La hipogammaglobulinèmia és un fet molt freqüent en pacients amb LLC-B (219-220,242). No és conegut el mecanisme que condueix a la disminució de les Ig (242,285). D'una banda existeixen alteracions en la població limfocitària T amb increment policlonal en la població

supressora (242,285). D'altra banda, els limfòcits B normals residuals responen malament als estímuls antigènics, potser per dilució o altres mecanismes no coneguts (241,285). Altres autors descriuen alteracions funcionals en la població NK en aquells malalts amb LLC-B que presenten hipogammaglobulinèmia (94). Finalment, la hipogammaglobulinèmia s'ha relacionat amb el grau d'infiltració medul·lar. En aquest sentit, Hijmans *et al* (286) van observar una gran correlació entre el nombre de cèl·lules productores d'Ig (IgM, IgG i IgA) al moll i els nivells sèrics que presentaven els malalts.

#### e. Autoimmunitat

Els fenòmens autoimmunes són freqüents en pacients amb LLC-B. En un 15-30 % de malalts es pot observar una anèmia hemolítica autoimmune. La freqüència de test d'antiglobulina directa positius pot arribar al 75 % dels malalts (287). Els anticossos són produïts pels limfòcits de la LLC-B; generalment són IgG d'acció tèrmica calenta i poden estar dirigits contra Ag del sistema Rh (anti-C). En un 2 % dels pacients s'observa plaquetopènia autoimmune. La neutropènia autoimmune i l'aplàsia pura de sèrie vermella són fenòmens autoimmunes menys freqüents (219-220,285).

#### 4. Infeccions.

Les complicacions infeccioses són freqüents entre els malalts de LLC-B i causen una mortalitat important (288). Les infeccions són degudes de forma majoritària a bacteris. Les infeccions virals i fúngiques són menys freqüents i generalment relacionades amb la progressió de la malaltia o el tractament de la mateixa. De forma prioritària les infeccions es localitzen a nivell respiratori, urinari i cutani. La hipogammaglobulinèmia és un factor predisposant i afavoridor dels episodis infecciosos (288). Els nivells de gammaglobulina mostren correlació amb el nombre d'infeccions patides l'any anterior. La producció d'Ac específics després de la vacunació està disminuïda suggerint un defecte en la capacitat de reconèixer l'Ag o una disminució de la producció policlonal d'Ig (289). Les alteracions en els limfòcits T o la

neutropènia no semblen tenir un paper important dintre de les infeccions en el global dels pacients (288).

### 5. Diagnòstic diferencial.

La LLC-B ha de diferenciar-se d'altres SLPC per orientar el pronòstic i tractament adequats. Les dades clíniques i exploratòries, així com l'examen bàsic dels paràmetres hematològics, ens permetran una primera discriminació entre les diverses entitats (taula 3.B.2.2). L'examen morfològic de la sang perifèrica és un element molt important pel diagnòstic diferencial entre les síndromes limfoproliferatives cròniques (SLPC). Els limfomes no Hodgkin (LNH) leucemitzats tenen una elevada proporció de centròcits i/o centroblasts a SP, la LPC o la forma mixta LLC/LPC presenten a la perifèria prolimfòcits (258). A la tricoleucèmia s'observen cèl·lules de tamany mitjà-gran, nucli reniforme, citoplasma ampli que presenta prolongacions i que característicament té activitat fosfatasa àcida tartrat resistent.

L'estudi immunològic ens ajuda en el diagnòstic diferencial dels diversos processos limfoproliferatius. En primer terme ens diferenciarà els processos limfoproliferatius de línia B dels de línia T, i en segon terme la diferent reactivitat per diversos AcMo ens suggeriran un o altre diagnòstic. Es característica la baixa intensitat de les Ig a la superfície del limfòcit de la LLC-B i l'expressió conjunta de AcMo de línia B amb AcMo del grup CD5. Les SLPC de línia B diferents a la LLC-B tenen una intensitat d'Ig superior, i generalment expressen FMC7 a la superfície (257-258).

L'aportació de la microscopia electrònica, la citogenètica, l'estudi anatomopatològic de moll d'os, gangli i melsa, i estudis microbiològics poden ser indispensables per la correcta catalogació del quadre limfoproliferatiu (220,257) (taula 3.B.2.2, 3.B.3.3 i 3.B.3.4).



Taula 3.B.2.1

Patrons histològics d'infiltració medul·lar de la LLC-B definits per Hernández Nieto *et al* (253)

---

---

NODULAR	L'arquitectura medul·lar està distorsionada en algunes arees de la secció per formacions nodulars constituïdes per limfòcits madurs sense centre clar i d'un tamany generalment superior al d'un nòdul limfoide normal. La resta de secció histològica està constituïda per hemopoesi normal.
INTERSTICIAL	Infiltració limfocitària d'intensitat variable que respecta l'arquitectura medul·lar i que substitueix en menor o major grau l'hemopoesi normal.
MIXTE	Combina els trets d'infiltració dels dos patrons anteriors (nodular i intersticial).
DIFUS	L'arquitectura medul·lar està completament alterada per desaparició del greix i substitució de l'hemopoesi per limfòcits d'aspecte madur.

---

---

## Taula 3.B.2.2

Principals dades clíniques i de laboratori en les leucèmies limfoides cròniques

	Edat°	H/M	Leucòcits 10x10 <sup>9</sup> /L	Ganglis	Melsa %	Pell	Altres
<b>Limfòcits B</b>							
LLC	60	2/1	10-200	50	50	5	J γglob. AHAI
LPC	65	4/1	100->500	25	>90	5	
MW	50	1/1	N-<50	30	30	<5	∫ IgM
LNH <sup>o</sup>	50	2/1	N->100	90	75	5	
TL	50	5/1	<1-100	30	>75	<5	Pancitopènia
<b>Limfòcits T</b>							
LLC	60	H>M	>20-200	50	50	10	
LPC	60	H>M	100->500	25	>90	<10	
LLTA	40	H>M	N->150	90	>50	>50	HTLV-1, ∫Ca osteolisi
Lf cutani	50	H>M	N->150	>50	10	100	
TL	0-60	H>M	<Normal	30	>75	---	HTLV-2
LCT	50	2/1	N->300	10	30	<10	Jgranulòcits fenotipus CD8

Edat°=Edat mediana en el moment del diagnòstic

H=home; D=dona; N=Normal

AHAI=anèmia hemolítica autoimmune

γglob=gammaglobulines

HTLV=human T leukemia virus

LLC=leucèmia limfàtica crònica

LPC=leucèmia prolimfocítica crònica

MW=macroglobulinèmia de Waldenström

LNH<sup>o</sup>=limfoma no Hodgkin leucemitzat

TL=tricoleucèmia

LLTA=leucèmia limfoma T de l'adult

Lf cutani= limfoma cutani

LCT=limfocitosi crònica T

Referència (220)

## Taula 3.B.2.3

## Principals trets fenotípics de les SLPC de línia B

	LLC	LLC/LPC	LPC	TL	TL-V	LCP	LF	LV	LDI
RM	++	+	-	-/+	-	-	-/+	-	-
IgS	+/-	+/-	++	++	++	-	++	++	+
IgC	+/-	+/-	+	+	+	++	-	-/+	-
CD5	++	++	-/+	-	-	-	-	-	++
CD19	+	++	++	++	++	-	++	++	++
CD20	+	++	++	++	++	-	++	++	++
CD24	++	++	++	-	-	-	++	++	++
CD22m <sup>o</sup>	-/+	-/+	++	++	++	-	++	++	++
CD23	++	-/+	-/+	-	-	-	-/+	-/+	-/+
FMC7	-/+	-/+	++	++	++	-	++	++	++
CD10	-	-	-	-	-	-/+	++	-	-/+
CD25	-	-	-	++	-	-	-	-	-
CD11c	-	-	-	++	+	-	-	-/+	-
CD38	-	-	-	-	-	++	-	+/-	-

LLC=leucèmia limfàtica crònica  
 LLC/LPC=forma mixta leucèmia limfàtica  
 crònica-leucèmia prolimfocítica  
 LPC=leucèmia prolimfocítica crònica  
 TL=tricoleucèmia  
 TL-V=tricoleucèmia variant  
 LCP=leucèmia de cèl·lules plasmàtiques

LF=limfoma fol·licular  
 LV=limfoma vellós esplènic  
 LDI=limfoma de diferenciació intermedia  
 RM=rossetes ratolí  
 IgS=immunoglobulines de superfície  
 IgC=immunoglobulines citoplasmàtiques  
 =ag de localització membranosa

Referència (257)

## Taula 3.B.3.4

## Principals trets fenotípics de les SLPC de línia T

CD	PL	LLTA	SS	LLC	LNH
CD2	++	++	+	++	+
CD3 (citopl)	++	++	++	++	++
CD3 (membr)	+	+	+	++	+
CD5	++	++/+	++	+/-	+
CD7	++	-/+	-/+	-/+	+/-
CD25	-/+	++	-/+	-	+/-
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	++	++	++	-/+	+/-
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	+	-/+	-/+	-	+/-
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	-/+	-	-/+	++	+/-
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	-/+	-/+	-/+	-	-/+
CD11b	-	-	-/+	+	-
CD16	-	-	-/+	+	-
CD57	-	-	-	+	-

PL= Prolimfocítica  
 LLTA= Leucèmia limfoma T de l'adult  
 SS= Síndrome de Sézary

LLC= Leucèmia limfàtica crònica  
 LNH= Limfoma no Hodgkin.

Referència (257)

## FACTORS PRONOSTICS A LA LLC-B

L'evolució clínica dels malalts amb LLC-B és molt **heterogènia**. Són pacients d'edat avançada que presenten només una elevació en la xifra de leucòcits, adenomegàlies o esplenomegàlia asimptomàtica, i amb freqüència tenen altres malalties associades. De forma global un grup de pacients no necessitaran tractament, i serà poc probable que la LLC-B sigui la causa de mort (fins un 29% en algun estudi (290)). La causa de mort en els malalts en estadi B i C està generalment en relació amb la LLC-B, mentre que un 50% de les morts dels malalts en estadi A no estan en relació amb la leucèmia. En l'evolució de la malaltia, un grup de pacients presentaran fracàs medullar amb anèmia o trombopènia greu, símptomes constitucionals o simptomatologia limfomatoide. Aquests malalts poden tenir un curs ràpidament progressiu de la malaltia amb medianes de supervivència inferiors als 2 anys. Entre aquest dos grups de pacients d'evolució tan diversa se situen la majoria de malalts que necessitaran tractament al llarg dels anys (270).

La identificació de factors pronòstics que permetin definir estratègies terapèutiques òptimes pels diversos tipus de malalt és molt important. S'han identificat diverses dades clíniques i analítiques que tenen relació amb la supervivència com, per exemple, l'edat i el sexe. No obstant, la trombopènia, l'anèmia, el nombre d'àrees limfoides afectades són, per la seva importància, les variables que s'han inclòs en les principals classificacions per estadis clínics (Rai i Binet). El patró d'afectació a la BMO, el temps de duplicació limfocitària, la presència de cèl·lules no típiques i dades immunològiques també tenen influència pronòstica. Tot seguit es descriuen les característiques dels pacients amb influència en la supervivència (290).

### Estadis clínics

El 1975, Rai *et al* (291) van proposar una classificació dels pacients en 5 estadis segons la presència o absència d'adenomegàlies, esplenomegàlia, hepatomegàlia, anèmia i trombopènia (taula 3.B.3.1). La

supervivència mediana de l'estadi 0 i I supera els 10 i 8 anys respectivament. Els malalts en estadis més avançats tenen una sobrevida mediana cada cop més curta, menor de 7 anys a l'estadi **II**, de 2 a 5 anys a l'estadi III i menor de 2 anys a l'estadi IV. A pesar dels cinc grups de pacients que descriuen Rai *et al*, la classificació delimita un grup de baix risc (0), un de risc intermig (I i II) i un de risc alt (III i IV). Els grups d'alt i baix risc representent un 25 % dels pacients cadascun i el grup intermig el 50 % restant (270).

Malgrat la seva utilitat, la classificació de Rai *et al* conté un grup intermedi amb un pronòstic molt heterogeni. Un subgrup de pacients té una expectativa de vida similar al de baix risc i un altre subgrup com la d'alt risc.

El 1981, Binet *et al* (290-293) van proposar un nou sistema de classificació clínica dividint els malalts en 3 categories (A, B i C) (taula 3.B.3.2). El grup en estadi més avançat, aquell que presenta anèmia o trombopènia, té una supervivència mediana inferior als 3 anys. La supervivència del restant 80 % de pacients depèn del nombre de territoris limfoides afectats clínicament. Binet *et al* consideren 5 territoris limfoides: cervical, axil·lar, inguinal (unilaterals o bi), melsa i fetge. Els malalts amb 2 o menys territoris s'inclouen en l'estadi A (mediana  $\geq 7$  anys) i el grup amb 3 o més territoris constitueixen l'estadi B (mediana  $\leq 5$  anys). La classificació de Binet *et al* tampoc resol l'heterogènia sobrevida del grup B.

El Taller Internacional per la LLC va proposar una integració dels dos sistemes subdividint el grup A en A(0), A(I) i A(II), el B en B(I) i B(II) i el C en C(III) i C(IV). La intersecció dels dos sistemes de classificació és incòmoda i generalment s'utilitza un dels dos sistemes. El grup cooperatiu francès per l'estudi de la LLC, en una sèrie molt àmplia de malalts, ha demostrat el valor de la subclassificació de Binet *et al* dintre de la classificació de Rai (294-295). D'aquesta anàlisi es desprèn que el grup A de Binet té la mateixa supervivència que el grup 0 de Rai (proporció de supervivents als 5 anys de 78 % contra 82 %). A més, la classificació de Binet aporta significat pronòstic dintre de cada estadi de

Rai, cosa que no succeix a la inversa (294-295). L'estadi A inclou la majoria de malalts de bon pronòstic. Dintre de l'estadi I permet delimitar un grup A(I) amb bon pronòstic (78 % als 5 anys) respecte el grup B(I) (52 % als 5 anys). L'estadi II permet subdividir-lo entre A(II) (68 % als 5 anys) respecte B(II) (38 % als 5 anys).

A part d'aquests sistemes de classificació clínica àmpliament utilitzats s'han descrit altres sistemes d'estadiatge basant-se en dades clíniques o analítiques amb importància en el pronòstic (296-299). D'entre ells destacar el descrit per Jaksic i Vitale (297), que van dissenyar un sistema de classificació atenent a la massa tumoral dels malalts. La massa tumoral s'obté de la suma del valor de l'arrel quadrada del nombre de limfòcits per nanollitre, el valor en cms. del diàmetre de l'adenomegàlia més gran i el valor en cms. de l'allargament de la melsa per sota la vora costal. Quan el valor de la massa tumoral total (MTT) és  $>9$ , la mediana de supervivència és de 39 mesos mentre que si la MTT és  $<9$ , la mediana és de 101 mesos. Aquest sistema és el millor indicador de la MTT, però en canvi és poc utilitzat en l'anàlisi de les sèries. Potser la relativa dificultat del seu càlcul respecte d'altres paràmetres més simples pugui explicar el seu baix ús.

### Limfòcits

La limfocitosi té incidència sobre la supervivència. La xifra de  $50 \times 10^9/L$  limfòcits permet dividir els malalts en dos grups de pronòstic diferent (300). A més, la distribució heterogènia de pacients en el grup de risc intermedi pot dividir-se en dos grups segons la xifra limfocitària. Els malalts amb recomptes  $\leq 30 \times 10^9/L$  tenen una supervivència similar al grup de baix risc (301-302).

Les dades morfològiques de la població limfocitària de sang perifèrica poden tenir importància pronòstica. La presència de cèl·lules feses ( $>5\%$ ) a SP s'ha relacionat amb una major incidència d'adenomegàlies (303), un percentatge  $>10\%$  de prolimfòcits o el seu nombre absolut influeix en el pronòstic dels pacients (240,304-305). Recentment, el grup cooperatiu Franco-Americo-Britànic (FAB) ha

proposat la definició de LLC mixta, tipus LLC/LPC pels casos amb un percentatge de prolimfòcits entre el 10 % i el 55 % (240). El tipus de cel·lularitat limfoide que infiltra la BMO, definida com **petita, fessa i mixta**, també configura grups diferents de pacients (256). El **grau d'infiltració limfoide** en la BMO també permet definir grups diferents (256).

### **Patró d'afectació medul·lar**

La distinció de diferents patrons d'afectació medul·lar ha conduït a l'anàlisi de la influència de cada patró a la supervivència. Estudis seqüencials del tipus d'infiltració medul·lar mostren que el patró reflecteix el procés dinàmic de la malaltia i el grau de creixement tumoral (305). La majoria d'estudis demostren correlació entre el patró histològic i la supervivència dels malalts (302,307-308). Els pacients amb patrons nodulars o intersticials sobreviuen més que els que presenten un patró difús. Els patrons no-difusos s'associen a estadis precoços, i el difús a estadis avançats (306,309-310). La realització de biòpsies seriades durant la progressió de la malaltia mostra el canvi de tipus d'infiltració de patró no-difús a difús (306,309,311). A més, la presència d'un patró difús condiona la progressió de la malaltia (306,311-313). Avui dia s'accepta la diferent supervivència entre els pacients amb patró histològic difús i aquells amb patró no-difús (nodular, intersticial o mixte) (309). No sols això, el patró de BMO sembla ser el millor factor aïllat pel pronòstic (307), si bé en algun estudi no es confirma (314).

La combinació de la classificació de Rai o Binet amb el tipus (no-difús, difús) d'afectació a BMO permet dividir els pacients en estadi precoç en dos grups de pronòstic diferent (311,313).

### **Cinètica cel·lular**

#### **1. Temps de duplicació limfocitari (TDL)**

L'increment continu de limfòcits en els pacients **no tractats** està associat a progressió de la malaltia (309). No sols la xifra de limfòcits o l'increment en la mateixa influeixen en la progressió, sinó que la velocitat



de duplicació dels limfòcits delimita 2 grups amb un risc de progressar diferent. Els malalts que dupliquen la xifra inicial de limfòcits en menys de 12 mesos tenen un pronòstic pitjor que els que el dupliquen després dels 12 mesos (315). El valor que té la determinació del TDL es demostra per la seva capacitat de delimitar una població de baix risc dintre dels grups 0, I i II o A i B de les classificacions de Rai o Binet.

El TDL es correlaciona amb l'estadi, la histologia de BMO, la necessitat de tractament i la supervivència (316). El valor inferior a 12 mesos té un caràcter independent d'altres variables (315). La significació dels TDL negatius i la seguretat que la determinació del TDL té el mateix valor en recomptes  $>50 \times 10^9/L$  com en els inferiors a aquesta xifra encara està per definir.

## 2. Index de proliferació

Els estadis avançats de la malaltia tenen més limfòcits en fase de síntesi que els estadis poc avançats. La determinació del nombre de limfòcits en fase S ( $\leq 1,7 \times 10^9/L$  vs  $> 1,7 \times 10^9/L$ ) és vàlid per separar poblacions amb diferent risc de progressió i necessitat de tractament dintre dels grups 0, I i II de Rai (317). La presència d'un major nombre de cèl·lules en síntesi indica més capacitat proliferativa de la malaltia i, en conseqüència, més agressivitat de la mateixa (318).

## Biòpsia ganglionar

La histologia dels ganglis afectes per LLC-B s'ha analitzat molt poc com factor pronòstic. Raphael *et al* (244) descriuen 4 patrons segons el nombre i la distribució de cèl·lules grans dintre del teixit. Els malalts en estadi C presenten més quantitat de cèl·lules grans que la resta, i en el grup B llur presència sembla definir un grup de pitjor pronòstic. No obstant, la importància del patró histològic ganglionar no està ben definida.

## Immunologia

### 1. Fenotipus

Diversos estudis han analitzat la influència del **fenotipus** de les cèl·lules malignes i de la població T residual en el pronòstic dels pacients amb LLC-B. No hi ha dades concluent respecte de si tenen influència i, si en tenen, sobre quins paràmetres. Els primers estudis van analitzar l'expressió del tipus de cadena pesada i lleugera. El valor que la cadena  $\mu$  aïllada té en el pronòstic és controvertit. Els pacients que expressen la cadena  $\mu$  estan en estadis més avançats que els que tenen la cadena  $\tau$  (319) o les cadenes  $\mu\delta$  (260). De forma similar, Orfao *et al* (310) troben més cadena  $\mu$  en malalts amb patró difús de BMO. En un estudi limitat a malalts en estadi A el fenotipus  $\mu$  mostra un pitjor pronòstic que el  $\mu\delta$  (320) i un menor temps lliure de tractament en els estadis 0, I i II (316). En canvi altres grups no troben diferències entre el grup  $\mu$  i el  $\mu\delta$  (321) i, en algun cas, es considera l'expressió de cadena  $\mu$  com factor de bon pronòstic (322).

El valor del tipus de cadena lleugera tampoc no està establert. Per alguns autors no influeix en el pronòstic (304,317), mentre que altres treballs donen un millor pronòstic a l'expressió de cadenes *kappa* (322). Han *et al* (323) van observar un predomini de cadenes *lambda* en un grup de malalts en estadi 0 que van progressar. L'anàlisi de la intensitat d'expressió de les Ig de superfície també té resultats aparentment contradictoris, (304) refereixen un pitjor pronòstic quan la intensitat d'Ig és elevada, mentre que en un altre estudi els pacients amb intensitat elevada presentaven recomptes limfocitaris inferiors a la resta de malalts (324). De la mateixa manera existeixen dades contradictòries sobre el valor de l'expressió de CD23 (325-326), CD25 (325-326), FMC7 (304,321) i CD9 (310,326). Altres Ag han sigut objecte d'anàlisi com el CD1, CD21 (263), CD5 (260,324), CD10 (327), sense que es disposi de dades concluent. Els pacients amb LLC-B de baixa capacitat de progressió semblen expressar menor intensitat de CD22, CD23, CD25 i CD71 que els malalts que progressen (328).

La població T residual també s'ha utilitzat per diferenciar grups de risc. El nombre de limfòcits CD3 no sembla influir en el pronòstic, el CD4 està significativament disminuït entre el grup 0 i III+IV, mentre que els nivells de CD8 són significativament diferents entre els grups A, B i C (274). S'han observat diferències en el nombre de limfòcits CD8<sup>+</sup> entre els malalts amb malaltia progressiva i aquells amb malaltia estable (275). El quocient CD4/CD8 tampoc sembla tenir importància pronòstica (276,277) o bé s'associa amb els nivells de IgG i IgA (278) i amb el nombre d'episodis infecciosos (279).

## 2. Immunoglobulines

Els nivells d'Ig tenen relació amb l'estadi de la malaltia (280). Els nivells baixos de gammaglobulines i Ig influeixen de forma negativa en la supervivència. Els nivells de gammaglobulines <700 mg/dL, d'IgA <80 mg/100dL, d'IgG <600 mg/100 dL configuren un grup de pitjor pronòstic. Els valors d'IgM no semblen influir. La presència d'hipoIgA té un valor pronòstic independent de l'estadi clínic del malalt, cosa que no s'observa amb la IgG ni les gammaglobulines (281). La importància dels nivells d'Ig no s'ha corroborat en altres estudis (282).

## 3. Estudis funcionals

Els estudis funcionals dels limfòcits B o T com indicadors d'un pronòstic diferent són molt escassos. Unicament s'ha vist que els pacients amb malaltia progressiva tenen més capacitat de sintetitzar IgM després de l'estímul amb TPA (283) i, respecte dels limfòcits T, la resposta mitogènica es relaciona amb nivells sèrics baixos del receptor per la IL-2 que tendeixen a trobar-se més baixos en estadis poc avançats (332).

## Citogenètica

La supervivència global dels malalts amb un cariotipus normal és superior a la dels pacients amb alteracions (230,333). A més, com major nombre d'anomalies existeixen o com més metafases presenten l'anomalia, pitjor és el pronòstic (230). La importància relativa de cada anomalia és

controvertida. La trisomia 12 aïllada incideix de forma negativa en el pronòstic, però és significativament més benigne que altres alteracions (229-231, 333), si bé en algun estudi és l'anomalia de pitjor pronòstic (233). Les anomalies múltiples o les que impliquen el cromosoma 14 presenten pitjor pronòstic (229-231, 233-333). Les alteracions citogenètiques són més freqüents en pacients amb malaltia activa i en estadis avançats (III i IV) i en aquells que han rebut tractament (234, 333). Les alteracions citogenètiques múltiples s'associen amb malaltia activa i amb menor temps lliure de tractament (229).

### Resposta al tractament

La resposta al tractament proporciona un millor pronòstic a la LLC-B. L'efecte sobre la supervivència és més acusat com més gran és la reducció de la massa tumoral (235-236, 335).

### Altres factors pronòstics

L'activitat ribonucleasa H s'ha correlacionat amb els estadis de Binet, i podria ser útil com indicador de la progressió de la malaltia (336). Els nivells sèrics del receptor d'IL-2 són més elevats com més avançada està la malaltia (332). La migració cel·lular dels limfòcits a través de columnes de col·lagena 3-D difereix dels estadis poc avançats als avançats. La migració també està disminuïda en pacients amb malaltia progressiva (337). Els nivells d'adenosina deaminasa, fosforilasa nucleotido purínica i LDH cel·lular també s'ha relacionat amb diferències morfològiques a les LLC-B en estadi precoç (338). El volum cel·lular, els nivells de receptor per glucocorticoides, els nivells de LDH, canvis en el patró de glicoproteïnes de superfície, el nivell de  $\beta 2$  microglobulina i altres també s'han referit com factors que influeixen en el pronòstic dels estadis de baix risc (339-344).

### LLC quiescent

Una altra qüestió que es planteja en l'estudi de la LLC-B és la capacitat per distingir els malalts en estadis precoços que progressaran

de forma més o menys ràpida d'aquells que romandran amb la malaltia immodificada durant molts anys (220). A la literatura està descrita una sèrie de 20 malalts en estadi 0 sense alteracions citogenètiques i amb malaltia estable per un període de 6,5 anys fins 24 anys (326). També Frisch *et al* (246) descriuen un grup de pacients amb un pronòstic molt bo (patró de BMO no-difús, poca limfocitosi i TDL allargat (buscar si és TDL o patró d'acumulació mínim a BMO)).

En un estudi recent de Montserrat *et al* (239) s'analitzen els factors que incideixen en la progressió de malalts en estadi precoç. De 134 pacients en estadi A prop del 25 % van progressar amb un risc actuarial acumulatiu del 31 % als 3 anys. Les dades clínic-analítiques amb capacitat de predir la progressió van ser: el nombre d'àrees limfoides afectades, el TDL ràpid i l'increment marcat de limfòcits. L'estudi de la progressió de 87 pacients en estadi 0 va mostrar que el 32 % van passar a l'estadi superior amb un risc actuarial acumulatiu del 28 % als 3 anys. La variable amb caràcter predictiu va ser els nivells baixos d'Hb. La supervivència dels malalts A(0) i A(I,II) no va ser estadísticament diferent, però la mediana del grup A(0) és de 125,7 mesos i de 91 mesos en la resta. La supervivència dels malalts en estadi A està relacionada amb la edat i el TDL ràpid, mentre que a l'estadi 0 està en relació amb la limfocitosi elevada i els nivells d'Hb en el nivell inferior de la normalitat. En aquest estudi, dels 261 pacients de la sèrie global aquells que complien els següents criteris: estadi A de Binet, patró de BMO no-difús, hemoglobina  $\geq 130$  g/L, limfocitosi  $\leq 30 \times 10^9$ /L i TDL  $> 12$  mesos conformen un grup de pacients amb una malaltia particularment benigna (LLC quiescent) que presenta una supervivència similar a la població control d'igual edat i sexe.

L'any 1989 el Taller Internacional per l'estudi de la LLC-B (345) va proposar els criteris de LLC quiescent a partir de les dades aportades pels grups cooperatius espanyol i francès (taula 3.B.3.3).

Taula 3.B.3.1

ESTADIS CLINICS DE LA LLC-B SEGONS LA CLASSIFICACIO DE RAI (1991)

---

Estadi 0	Limfocitosi perifèrica $\geq 15 \times 10^9/L$ Infiltració del moll d'os $> 40 \%$
Estadi I	Limfocitosi Adenopaties
Estadi II	Limfocitosi Esplenomegàlia i/o hepatomegàlia (adenopaties + o -)
Estadi III	Limfocitosi Anèmia (Hb $< 110$ g/L)(adenopaties, visceromegàlies + o -)
Estadi IV	Limfocitosi Plaquetopènia ( $plq < 100 \times 10^9/L$ ) (adenopaties, visceromegàlies i anèmia + o -)

---

Taula 3.B.3.2

ESTADIS CLINICS DE LA LLC-B SEGONS LA CLASSIFICACIO DE BINET

(292-293)

---

ESTADI A	Àrees limfoides < 3 No anèmia ni plaquetopènia
ESTADI B	Àrees limfoides > 3 No anèmia ni plaquetopènia
ESTADI C	Anèmia (<100 g/L) i/o plaquetopènia (<100x10 <sup>9</sup> /L) Independent de les àrees limfoides afectades

---

Binet *et al* consideren 5 àrees limfoides: cervical, axil·lar i inguinal independentment de que la seva afectació sigui unilateral o bi, melsa i fetge.

## Taula 3.B.3.3

## CRITERIS DE DEFINICIO DE LLC QUIESCENT

	Montserrat <i>et al</i> (239)	IWCLL (345)
Estadi clínic	A	A(0), A(I)
Hemoglobina	≥ 130 g/L	≥ 125 g/L
Limfòcits	< 30x10 <sup>9</sup> /L	< 30x10 <sup>9</sup> /L
Patrò BMO	No difús	No difús
TDL	>12 mesos	>12 mesos

IWCLL= *International Workshop on chronic lymphocytic leukemia*

BMO= biòpsia de moll d'os

TDL= temps de duplicació limfocitari



## TRACTAMENT

L'elecció de la terapèutica a administrar als pacients amb LLC-B planteja diversos problemes derivats de les característiques biològiques de la malaltia i de l'heterogènia evolució clínica dels malalts. El primer punt a considerar és quin és el moment idoni per iniciar la terapèutica, i el segon punt quin esquema és preferible.

La quimioteràpia actual no provoca remissions clonals estables i, per tant, ha d'anar dirigida a la millora de la supervivència dels malalts (346). El conjunt de malalts amb LLC-B té una supervivència inferior a la població general, observant-se la diferència més gran en els estadis avançats (estadi C de Binet) mentre que els malalts en estadis poc avançats tenen una supervivència més semblant a la de la població general. Aquest fet queda reflectit en els estudis presentats per grups cooperatius (espanyol i francès) que delimiten un subgrup de pacients amb una supervivència igual a la població general d'igual edat i sexe (346-347). Considerant aquests fets, els malalts en estadis avançats es poden beneficiar de protocols terapèutics més agressius que condueixin a una millora de la supervivència, mentre que en els pacients amb LLC quiescent poden assajar-se protocols experimentals orientats a erradicar el clon maligne (347). A més, el tractament dels malalts en estadi precoç ha de limitar-se a aquells que presentin factors de mal pronòstic (limfocitosi important, temps de duplicació limfocitària ràpid, patró difús de BMO)(346) o bé quan s'observi progressió de la malaltia (347).

Les principals modalitats terapèutiques utilitzades en malalts amb LLC-B són els agents alquilants, corticoides i radioteràpia. Com ja s'ha mencionat, cap dels tractaments actuals no és capaç d'erradicar el clon maligne. L'observació de remissions completes en el curs d'infeccions virals suggereix que la modificació biològica que aquesta provoca pugui jugar un paper important en la remissió. Per això el paper dels immunomoduladors com agents inductors de RC s'ha de tenir en compte en estadis precoços de la malaltia (346).

## 1. Quimioteràpia

La introducció del CLB el 1952 va suposar la pràctica desaparició dels fàrmacs emprats amb anterioritat (220). L'administració de CLB inclou dosi de 0,1 a 0,2 mg/kg de pes cada dia, reduint-la quan la malaltia està controlada o si apareix toxicitat. També es pot administrar una dosi superior (0,4-0,6 mg/kg) de forma intermitent amb una periodicitat de 2 a 4 setmanes. Els dos esquemes tenen una proporció semblant de respostes (60 %), però l'administració intermitent té menys toxicitat hematològica (220,347-349).

L'administració de CLB intermitent no sembla donar cap avantatge en la supervivència respecte de la simple observació en malalts en estadi I i II (350-351). En canvi, la progressió de la malaltia als 5 anys d'evolució és més elevada en el grup d'observació que en el grup sota tractament (77 % vs 55 %) (350-351). El paper del tractament amb CLB en estadis avançats no està encara ben establert. La progressió de la malaltia sota tractament amb CLB es relaciona amb una supervivència pitjor. Per tant, sembla millor no tractar els pacients fins que la malaltia progressi (351).

La corticoteràpia es pot utilitzar per controlar la xifra de leucòcits i per tractar els fenòmens autoimmunes associats. S'observa una reducció ràpida del tamany de les adenopaties i visceromegàlies amb dosis de 30 a 60 mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal de prednisona. No obstant el percentatge de remissions és menor que l'obtingut amb altres fàrmacs. La seva utilització com únic agent s'entèn quan hi ha trombopènia o anèmia autoimmune o una falta de resposta a altres agents en malaltia avançada (220,347).

La ciclofosfamida sembla menys efectiva que el CLB, però l'absència de reactivitat creuada amb ella la fa molt útil en malalts que no responen al CLB (220). La dosi habitual és de 2 a 3 mg/kg de pes diari o 20 mg/kg cada 2 o 3 setmanes. El busulfan és actiu contra la LLC, si bé amb menor potència que el CLB o la CFM (220).

L'eficàcia del CLB i dels glucocorticoides de forma aïllada va conduir a l'associació dels dos agents. Els percentatges de respostes quan s'empra la combinació són superiors, però la resposta obtinguda no es tradueix en una prolongació significativa de la supervivència respecte de la monoquimioteràpia (220). L'esquema intermitent (0,4 mg/Kg oral dies 1 i 2 de CLB i 40 mg/m<sup>2</sup> oral de PDN dies 1 a 5, cada 2 setmanes) sembla més efectiu i és menys tòxic que l'administració diària, si bé encara no hi ha dades concluints al respecte (220,347-348). Els pacients no tractats prèviament responen millor a la combinació, i els malalts en estadis poc avançats semblen respondre millor que els estadis avançats (347).

En malalts en estadis avançats s'han utilitzat diverses combinacions de fàrmacs: vincristina, prednisona i CFM (220), CFM, melfalan i prednisona (352), CFM, PDN, vincristina i adriamicina (CHOP) (353-354) cisplatí, dexametasona i dosis elevades d'arabinòsid de citosina (355), entre altres. La proporció de respostes amb els diversos esquemes poliquimioteràpics acostuma a ser superior o igual als obtinguts amb CLB intermitent sol o associat a prednisona (220,353-354). Per tant, els esquemes de quimioteràpia combinada tenen màxima utilitat en el tractament de malalts refractaris al CLB (220,352-353).

El grup cooperatiu francès per l'estudi de la LLC ha analitzat de forma prospectiva l'efecte de l'esquema CHOP en malalts en estadi C. Aquesta quimioteràpia millora la supervivència dels malalts respecte de l'obtinguda amb altres esquemes terapèutics (318,351,356). De moment, és la primera descripció d'un esquema amb efectes positius en aquest grup de malalts. No cura la malaltia, però disminueix la velocitat de progressió i allarga la supervivència.

L'increment de leucèmies agudes mieloides després del tractament amb agents alquilants, amb una incidència anual del 8 % en algun estudi, junt amb els resultats terapèutics d'aquests esquemes, fan recomanable deixar-los per fases avançades i malalts refractaris (220,295).

El paper de la quimioteràpia de manteniment en aquesta entitat és desconegut. El manteniment no és efectiu en malalties relacionades i la

seva avaluació correcta precisa de tractaments perllongats (220). En aquest sentit, Foon *et al* (295) refereixen una milloria en la supervivència de malalts en estadi III i IV sotmesos a tractament quimioteràpic prolongat (>18 mesos) (295).

En resum, els pacients en estadis A (0,I) no semblen beneficiar-se del tractament respecte de la supervivència. L'esquema terapèutic inicial en pacients en estadi avançats o malaltia progressiva és la combinació CLB+PDN sense oblidar els bons resultats obtinguts amb la poliquimioteràpia tipus CHOP en els estadis més avançats (III, IV o C). (347).

## 2. Radioteràpia

S'ha avaluat l'efecte de la radioteràpia corporal total, la irradiació nodal total, la irradiació hemicorporal i altres tipus de radioteràpia en el tractament de la LLC-B (347). L'aplicació d'irradiació corporal total en pacients amb malaltia avançada (de 10 a 40 Gy repartits en dosis de 5 a 10 cGy/d cada 3 dies) permet obtenir unes respostes superiors al 80% dels pacients millorant la supervivència en els que presenten resposta completa (357). No obstant, la toxicitat d'aquest règim terapèutic és important, i estan lligats el grau de resposta i la toxicitat. A més, la qualitat de la resposta no és superior a l'obtinguda en tractaments amb clorambucil. Per tant, la radioteràpia total pot ser útil en algun pacient en estadi avançat refractari a la quimioteràpia.

La radioteràpia local s'ha utilitzat quan les adenomegàlies comprometen la funció d'òrgans vitals o quan hi ha lesions doloroses (295).

## 3. Altres mesures

L'esplenectomia és especialment útil quan l'anèmia immune o trombopènia no responen als glucocorticoides; quan existeix pancitopènia o esplenomegàlia dolorosa (220,358). L'esplenectomia no és curativa, però millora els paràmetres hematològics dels malalts amb esplenomegàlia. El

valor de l'esplenectomia a la LLC-B no s'ha determinat encara en estudis prospectius (347).

La leucafèresi s'ha emprat en pacients amb ofegament medullar, i major probabilitat de toxicitat per la quimioteràpia, **observant-se increments en la xifra d'hemoglobina i plaquetes en alguns d'ells**. Malgrat l'efectivitat individual no és un tractament de primera línia, però pot ser útil en situacions especials (220).

L'elevada incidència d'hipogammaglobulinèmia i la seva relació amb els episodis infecciosos dels malalts amb LLC-B ha induït l'estudi de l'aport d'Ig en aquests pacients. L'administració d'Ig per via intramuscular ha donat resultats equívocs. L'administració d'Ig purificades per via intravenosa en malalts amb història d'infeccions de repetició o amb elevat risc per elles ha conduït a una important reducció en el nombre d'infeccions i en la gravetat de les mateixes (295,359).

#### 4. Noves terapèutiques

##### A. Anticossos monoclonals.

L'efecte terapèutic de la infusió d'AcMo ha sigut investigat per diversos grups (360-361). La infusió d'AcMo del grup CD5 provoca una disminució transitòria en la xifra de leucòcits sense alterar ganglis, moll o altres òrgans afectats (295,349). Els efectes indesitjables són escassos, però el futur dels AcMo en la terapèutica de la LLC-B sembla encaminada a l'administració d'AcMo lligats a toxines o drogues citotòxiques o a l'administració d'AcMo anti-idiotípus en estadis precoços de la LLC-B (347,349).

##### B. Interferó

Existeixen encara pocs treballs que analitzin l'efecte de l'IFN en el tractament de la LLC-B. El protocol que Foon *et al* (362) **van aplicar** a malalts en estadis avançats i prèviament tractats va donar uns resultats poc esperançadors. L'administració d'IFN en malalts no tractats

prèviament en estadis A i B va induir respostes en el 50 % dels pacients (363). En el mateix sentit, diversos treballs refereixen una disminució de la xifra de limfòcits en els pacients (estadis 0, I, II) **tractats amb IFN** (364-368).

### C. Nous citotostàtics

#### Fludarabina

Keating *et al* van assajar l'efectivitat de la fludarabina (9- $\beta$ -D-arabinosilfuranosil 2 fluoro-adenina monofosfat) en 75 pacients de LLC-B prèviament tractats (369). La taxa global de respostes va ser del 56 % amb un 36 % de refractarietat. La supervivència està en relació amb la resposta al tractament, sense que la quimioteràpia prèvia tingui influència en la mateixa. La fludarabina és efectiva en malalts prèviament tractats, obtenint-se una resposta ràpida (<3 cicles). Els resultats són encoratjadors i són necessaris més estudis per clarificar el seu paper en la terapèutica de malalts de LLC-B, tractats prèviament o no (295,369).

#### Deoxicoformicina

La 2-deoxicoformicina, inhibidor de l'adenosina deaminasa, s'ha mostrat també activa en malalts amb LLC-B. De 48 malalts tractats amb aquest agent, 13 van respondre (370).

### D. Transplantament de moll d'os

El nombre de casos de LLC-B sotmesos a TMO és molt escàs (6 pacients). El TMO es va realitzar en pacients amb malaltia avançada. En 3 casos s'ha assistit a una prolongada supervivència sense malaltia i la resta de malalts van morir (349). Aquests resultats **suggereixen** que la radioquimioteràpia intensiva utilitzada en l'**acondicionament** del transplantament pot erradicar la clona leucèmica. De **totes** maneres aquesta opció terapèutica està limitada a un petit nombre de malalts.

## E. Promotors de la diferenciació

Certes substàncies capaces d'induir la diferenciació *in vitro* dels limfòcits de la LLC-B s'han assajat com tractament d'aquesta malaltia. L'àcid retinoic no va ser eficaç en pacients amb LLC-B i sí en malalts amb LPC-B (349). L'escàs nombre de malalts i la curta experiència amb ells obliguen a dur a terme més assaigs per la seva possible aplicació futura.

### 5. Disseny de protocols i valoració de la resposta

L'anàlisi de la resposta obtinguda amb els diversos esquemes terapèutics s'ha fet mitjançant uns criteris establerts per cada grup. La falta d'un criteri uniforme, entre altres de:

- l'elecció dels pacients aptes per a ser inclosos en protocol (diagnòstic acurat de LLC-B, situacions clíniques determinades)
- nombre de tractaments previs a l'actual protocol
- la valoració de cada tipus de resposta (remissió completa -RC; remissió parcial -RP; progressió de la malaltia -PM)

impedeix una valoració i interrelació dels assaigs terapèutics entre els diversos grups.

Per aquest motiu el National Cancer Institute (NCI)-Sponsored Chronic Lymphocytic Leukemia Working Group ha proposat uns criteris estandard que permetin la comparació dels assaigs entre els diversos grups investigadors (371). La taula 3.B.4.1 recull els criteris de resposta proposats pel NCI. El Taller Internacional per l'estudi de la LLC-B també ha proposat l'adopció d'uns criteris uniformes per valorar la resposta obtinguda (372) (taula 3.B.4.2).

Taula 3.B.4.1

## CRITERIS PER VALORAR LA RESPOSTA AL TRACTAMENT - NCI (371)

	Remissió <sup>o</sup> completa	Remissió <sup>o</sup> parcial	Progressió malaltia
<u>Exploració</u>			
Ganglis	Absents	Reducció $\geq$ 50 % nous ganglis	Increment $\geq$ 50 %
Fetge/melsa	No palpables	Reducció $\geq$ 50 % palpables de nou	Increment $\geq$ 50 %
Símptomes	Absents	-----	-----
<u>Sang perifèrica</u>			
Neutròfils	$\geq 1,5 \times 10^9/L$ milloria $> 50 \%$	$\geq 1,5 \times 10^9/L$ ó	-----#
Plaquetes	$> 100 \times 10^9/L$ milloria $> 50 \%$	$> 100 \times 10^9/L$ ó	-----#
Hemoglobina (no transfós)	$> 110$ g/L	$> 110$ g/L ó milloria $> 50 \%$	-----#
Limfòcits	$\leq 4 \times 10^9/L$	Reducció $\geq 50 \%$	Increment $\geq 50 \%$
<u>Moll d'os</u>	$< 30 \%$ limfòcits	-----	-----

<sup>o</sup> La RC requereix tots els criteris durant un període  $>2$  mesos. Es necessari el mielograma o la BMO per documentar la resposta com completa.

<sup>o</sup> La RP requereix tots els criteris mencionats per un període  $>2$  mesos

# En absència d'altres indicis de progressió clínica, la presència de reducció  $\geq 20$  g/L d'hemoglobina, o una reducció  $\geq 50 \%$  en el recompte de plaquetes i/o el recompte absolut de granulòcits no exclourà la continuïtat del pacient en l'estudi.



## Taula 3.B.4.2

CRITERIS PER VALORAR LA RESPOSTA AL TRACTAMENT - *IWCLL* (372)

Resposta	Criteri
Resposta Completa	No evidència de malaltia#
Resposta Parcial	Canvi d'estadi C a A ó B, o d'estadi B a A
Malaltia estable	No canvi en l'estadi de la malaltia
Malaltia progressiva	Canvi de estadi A a B ó C, o d'estadi B a C.

# La resposta pot ser clínica o clonal. Inclou l'absència de signes de malaltia, limfòcits  $<4 \times 10^9/L$ , granulòcits  $>1,5 \times 10^9/L$ , plaquetes  $>100 \times 10^9/L$  i aspirat medullar i biòpsia normals. Si és possible s'inclourà la normalització de les poblacions T i B, de la distribució *kappa/lambda* i la presència menor al 25% de limfòcits B CD5<sup>+</sup>.

## ACTIVITAT NATURAL KILLER A LA LLC-B

L'any 1976, Behelak *et al* van realitzar els primers estudis d'ANK a la LLC-B (216). Van comparar la citotoxicitat provocada pels leucòcits totals de pacients amb LLC-B front a cèl·lules esplèniques de ratolí amb la de controls. L'ANK dels pacients va ser molt inferior a la que expressaven els controls.

El 1980 Platsouscas *et al* van analitzar l'activitat lítica de 12 malalts amb LLC-B (373). Els pacients tenien el nombre de limfòcits T disminuït percentualment, però augmentat en termes absoluts. La citotoxicitat es va estudiar amb cèl·lules T purificades mitjançant el roseteig amb hematies de moltó tractades amb neuraminidasa (limfòcits E<sup>+</sup>) i amb limfòcits T<sub>H</sub> purificats per roseteig amb hematies humanes lligades amb sèrum Ripley, que separa de forma específica els limfòcits amb receptors Fc. L'activitat lítica produïda per la població E<sup>+</sup> o la població Ripley<sup>+</sup> era inferior a la normal. El tractament *in vitro* de la població E<sup>+</sup> o de la Ripley<sup>+</sup> amb IFN augmenta l'ANK sense aconseguir-se la normalització.

El 1981 Ziegler *et al* van estudiar la capacitat dels limfòcits de 12 pacients per produir lisi espontània (217). Els malalts estaven en diversos estadis clínics i alguns rebien tractament amb CLB i PDN. L'activitat NK es va valorar front a diverses línies cel·lulars (K562, Molt4, HSB-2 i P-815) i van emprar limfòcits purificats (E<sup>+</sup> o B<sup>-</sup>). La puresa de la població testada va oscil·lar entre 93 % dels limfòcits E<sup>+</sup> i el 70 % de la deplecció amb AcMo. L'ANK dels limfòcits E<sup>+</sup> dels pacients era molt inferior als valors control, àdhuc en proporcions D:E més elevades. La disminució de l'ANK s'observava en 11 dels 12 malalts i era independent de l'estadi de la malaltia. Com que l'ANK de la fracció E<sup>+</sup> representa aproximadament el 50% de l'ANK de la CMN, els autors van analitzar la citotoxicitat després d'eliminar els limfòcits B per acció d'un AcMo pan B més complement (limfòcits B<sup>-</sup>). L'ANK obtinguda amb els limfòcits B<sup>-</sup> era similar a l'obtinguda amb la fracció E<sup>+</sup>. Un dels pacients va expressar citotoxicitat amb aquest mètode de purificació mentre que no en posseïa amb limfòcits E<sup>+</sup>. La baixa ANK observada no semblava deguda a un efecte competitiu

per part dels limfòcits de la LLC-B amb la cèl·lula diana marcada, ja que el percentatge de limfòcits que s'unia a la línia diana no variava amb l'addició de limfòcits leucèmics. A més, van observar com el percentatge d'unió dels limfòcits dels pacients a la línia K562 era similar a la que mostren els controls. Per tant la disminució en l'ANK no podia explicar-se per una dificultat en la unió amb la diana. La perllongació de l'assaig de citotoxicitat a 18 hores aconseguia millorar, però no normalitzar, l'ANK. Finalment, van testar la citotoxicitat provocada després de l'estimulació amb interferó. Dos pacients van millorar de forma notable la seva capacitat lítica, mentre que els 3 restants pràcticament no la van modificar. La resposta a l'interferó es va obtenir en pacients en estadi 0 que no rebien tractament.

L'any 1982 Pattengale *et al* (374) van estudiar l'ANK de 16 pacients amb LLC-B i, en una altra vessant, la sensibilitat a la lisi dels limfòcits neoplàsics per CNK normals. En els estudis de citotoxicitat van utilitzar cel·lularitat provinent de la fracció E<sup>+</sup> i algun assaig es va realitzar després de l'estimulació amb interferó. En el primer aspecte de l'estudi, l'ANK dels 12 pacients estudiats va ser inferior a la control. L'interferó va augmentar la capacitat de lisi sense normalitzar-la. En el segon aspecte, la cel·lularitat neoplàsica d'un grup de pacients era lisada per CNK d'individus sans després de la incubació amb IFN. Aquesta característica es va relacionar amb la forma estable de malaltia. D'aquesta manera la lisi mitjana provocada en els limfòcits B de 13 pacients amb malaltia estable era de 12,8 % ± 1 enfront del 1 % ± 0,4 dels 4 pacients amb malaltia progressiva.

Foa *et al* (375) el 1984, en una sèrie de 20 pacients amb LLC-B van observar també una disminució en l'ANK desenvolupada per la fracció E<sup>+</sup>. L'interferó va provocar un augment de l'ANK sense arribar als nivells de la població normal. En contrast amb el descrit per Ziegler *et al* (217), la capacitat d'unir-se a la diana dels pacients descrits per Foa *et al* és inferior a la normal.

Més tard, l'any 1984, Kay *et al* (376), coneixent la baixa citotoxicitat que provoquen els limfòcits dels malalts amb LLC-B a pesar de tenir una capacitat d'unió normal, van estudiar la morfologia i el fenotipus dels limfòcits NK. La morfologia de les cèl·lules que s'uneixen a la línia K562 correspon a un limfòcit gran, però que de forma característica i anòmala, no presenta granulació atzuròfila. El fenotipus d'aquesta població cel·lular és similar a l'expressada pels controls. L'anàlisi de la morfologia de la població purificada CD11b<sup>+</sup> o FcR<sup>+</sup>, antígens expressats en CNK, correspon a limfòcits grans, però agranulats. La disminució de l'ANK observada en els pacients amb LLC-B es va relacionar amb la manca de granulació observada en les cèl·lules suposadament efectores. L'absència de grànuls no té un mecanisme conegut, però els autors proposen dues hipòtesis: i) la població NK està en un estadi immadur, ii) la falta de grànuls reflecteix l'estat post-unió normal provocat per un augment de les cèl·lules diana en els malalts amb LLC-B (el limfòcit neoplàsic actuaria com diana permanent).

Posteriorment, l'any 1986 Alvarez de Mon *et al* (377) van analitzar l'efecte del  $\tau$ -IFN i de sobrenedants que contenen IL-2 sobre l'ANK de la fracció E<sup>+</sup> de malalts amb LLC-B. L'estudi inclou 26 pacients en diversos estadis i que no rebien tractament. L'ANK de la fracció E<sup>+</sup> és inferior a la de la població control. La incubació amb sobrenedants que contenen IL-2 provoca un augment en la citotoxicitat amb un màxim a les 18 hores d'incubació. El  $\tau$ -IFN provoca un augment de citotoxicitat en els controls sense observar-se aquest efecte o obtenint un increment mínim en els pacients. Per contra, la incubació amb sobrenedants que contenen IL-2 provoca un augment significatiu en la citotoxicitat de la fracció E<sup>+</sup> dels pacients. L'increment és més acusat en els pacients sense citotoxicitat espontània i sense resposta al  $\tau$ -IFN. Els autors examinen la capacitat de producció d'IL-2 per part de la població T dels malalts amb LLC-B per valorar si la disminució en l'ANK fos secundària a una síntesi disminuïda d'IL-2. Els nou pacients examinats mostraven una síntesi IL-2 similar a la dels controls. Més tard, aquest mateix grup (35) va analitzar l'ANK en un grup de 28 pacients no tractats en diversos estadis clínics i 7 malalts en estadi 0 sota tractament amb CLB. El grup no tractat tenia una ANK tant de la CMN de SP com de la fracció E<sup>+</sup> significativament reduïdes

respecte de la població control. En canvi, els 7 malalts tractats desenvolupaven una citotoxicitat similar a la de la població control (tant la CMN de SP com la fracció E<sup>+</sup>). Els autors van descartar la presència d'una població inhibidora dintre de la fracció E<sup>+</sup> dels pacients amb LLC-B no tractats que expliqués la baixa ANK respecte dels grup tractat i control. Si bé no comparen l'ANK dels malalts en estadi 0 no tractats i tractats, sí que realitzen la comparació entre els malalts no tractats segons l'estadi clínic. No observen diferències entre els estadis 0, I i II+III per la qual cosa s'ha d'inferir que l'ANK dels malalts en estadi 0 no tractats és significativament inferior a la del grup tractat.

L'efecte de la IL-2 sobre l'ANK en la LLC-B va ser estudiat també per Kay *et al* (378). L'estudi inclou sis pacients amb poca citotoxicitat contra diverses línies NK sensibles. El defecte era independent del seu estadi o de tractament previ. La incubació amb IL-2 va induir un augment en la citotoxicitat. L'augment era evident a les 2-4 hores d'incubació amb una meseta d'efecte a les 24 hores. Aquests estudis es van completar amb l'aspecte morfològic de poblacions de LGG purificades. El grup de Kay *et al* havia descrit prèviament una desaparició dels grànuls en els limfòcits efectors de la LCC-B (376). Després de la incubació amb IL-2 es produeix un augment de la granulació fins arribar a la normalitat a les 24 hores.

L'any 1987 Khonina *et al* (125) van efectuar estudis de citotoxicitat en malalts amb LLC-B. L'ANK era inferior a la població control, però no era indetectable com en altres estudis. El comportament de l'ANK de la CMN de controls i pacients no és el mateix. Mentre que en la població control la incubació de la CMN, la fracció E<sup>+</sup> i la fracció no T provoca una disminució o desaparició de l'ANK a les 24 - 48 hores, amb un efecte molt més intens a la CMN, en els malalts amb LLC-B aquesta disminució no s'observa. En contra del referit per Kay *et al* (376,378), Konhina *et al* observen una ANK a la fracció E<sup>-</sup> (29,1 % ± 1,5) dels pacients similar a la que té la fracció E<sup>+</sup> (27,9 % ± 2). La pèrdua d'activitat NK observada en els controls durant la incubació es relaciona amb la interacció entre la població T i B, que provoca una diferenciació de limfòcits T i una pèrdua de la capacitat citotòxica. L'alteració funcional de la població B a la LLC-

B pot causar l'absència d'interacció i el manteniment de l'ANK. En un estudi posterior, aquests autors van separar dues poblacions diferenciades de CNK mitjançant gradients de Percoll. Van obtenir una població de baixa densitat que no respon a l'IFN i que lisa sobretot cèl·lules B leucèmiques de LLC-B variant (379).

La disminució de l'ANK en la LLC-B ha sigut referida també per Srskaar *et al* (163). La purificació de la població E<sup>+</sup> provoca un augment, però no la normalitza. Consideren que la disminució en l'ANK és deguda, com a mínim de forma parcial, a creixement de població leucèmica. L'ANK del moll d'os dels pacients no difereix de la dels controls.

Allen *et al* (113), motivats per estudis que demostraven l'efecte de la cimetidina sobre la funció limfocitària i el seu efecte antitumoral en rates i algun tumor humà, van estudiar les modificacions que el tractament amb cimetidina per via oral provocava en un grup de malalts amb LLC-B. La cimetidina es va administrar a 7 pacients amb LLC-B i es va mesurar la seva ANK en diverses ocasions. L'ANK basal de la fracció E<sup>+</sup> era baixa o indetectable. Als 28 dies de l'administració de cimetidina l'ANK dels pacients era superior a la basal sense arribar a normalitzar-se. Els controls mostraven una disminució en l'ANK al 14<sup>e</sup> dia d'ingestió de cimetidina per retornar als valors basals el 28<sup>e</sup> dia. La cimetidina no va provocar un augment del nombre de limfòcits totals ni de la fracció E<sup>+</sup> en els pacients ni controls. A l'estudiar l'efecte de la cimetidina *in vitro* també van observar diferències entre controls i pacients. Així, mentre en els controls la incubació amb cimetidina durant 48 hores provoca un augment de l'ANK, aquest efecte no s'observa en els pacients amb LLC-B. Els autors creuen que la cimetidina no provoca un augment en el nombre de conjugats a la cèl·lula diana ni augmenta la capacitat de reciclatge, però sí que incrementa el nombre de conjugats que condueixen a la lisi.

## FENOTIPUS DE LES CNK A LA LLC-B

En els últims anys s'ha estudiat el nombre i el fenotipus de les CNK en pacients amb LLC-B, així com la distribució de la resta de poblacions limfocitàries.

Velardi *et al* (380) van observar un nombre similar de limfòcits CD8<sup>+</sup> en controls i pacients amb LLC-B. No obstant, el percentatge de limfòcits CD8<sup>+</sup> que expressaven CD57 era més elevat en el grup de pacients amb LLC-B que en el grup control. El nombre absolut de limfòcits CD4<sup>+</sup> a la LLC-B pot estar disminuït respecte dels controls amb un decrement en el quocient CD4/CD8. Un altre fet destacat per aquests autors és l'expressió de forma molt superior a la població normal de CD57 i CD11b dintre dels limfòcits CD4<sup>+</sup>. A més, els limfòcits CD4<sup>+</sup> dels pacients amb LLC-B tenen morfologia de LGG. L'alteració fenotípica de les poblacions CD4 i CD8 s'acompanya també d'un augment en el nombre absolut de limfòcits CD57<sup>+</sup> respecte dels controls (589±90/μL vs 179±24/μL). Aquestes alteracions fenotípiques en la distribució de les poblacions limfocitàries T podrien explicar de forma parcial el defecte del seu funcionalisme a la LLC-B. De forma similar, ja l'any 1984 Foa *et al* van observar que el nombre de limfòcits E<sup>+</sup> que expressaven el CD57 era superior al que tenia la població normal, independent de l'estadi clínic (375). Més tard, els mateixos autors (381) van examinar l'expressió de CD16 mitjançant 3 AcMo (Leu-11, A10, AB8.28) en la fracció E<sup>+</sup> en pacients amb LLC-B. De forma independent de l'estadi clínic el percentatge de limfòcits T dels pacients amb LLC-B que reaccionen amb AcMo que reconeixen el CD16 és inferior al que s'observa en la població normal (Leu11 2,5%±1.9 vs 13.5±4.5). Per tant, existeix una distribució anòmala dels limfòcits amb molècules relacionades amb les CNK (131).

En un altre aspecte, Kay *et al* (376) van observar que el percentatge de CD11b entre limfòcits E<sup>+</sup> i FcR<sup>+</sup> de pacients amb LLC-B era similar a la població control, si bé la seva morfologia era diferent. Mentre que en els controls l'aspecte era de LGG, en els pacients aquests limfòcits eren grans, però agranulats.

Vuillier *et al* (273) van aprofundir en l'estudi de la població T en els pacients amb LLC-B. L'anàlisi de la distribució de les poblacions limfocitàries en 27 malalts de LLC-B va mostrar un augment del nombre de limfòcits CD3, CD4, CD8 i NK comparats amb 47 individus sans. L'augment de CD8 era més acusat que el de CD4. Dintre de les subpoblacions CD4 van observar sobretot un augment de la població CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> (inductors de la col·laboració) mentre que s'assisteix a una disminució de la població CD4<sup>+</sup>CD45r<sup>+</sup> (inductors de la supressió) en l'estadi C. Dintre de les subpoblacions CD8<sup>+</sup> s'observa de forma preferent un lleuger increment del fenotipus CD8<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> (citotòxic) amb un lleuger decrement percentual, que no absolut, de la població NK (CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>).

Kimby *et al* (382) també observen l'increment de limfòcits CD4, CD8, CD57 i CD16 i l'alteració en el quocient CD4/CD8 en els pacients amb LLC-B respecte dels controls. Quan analitzen el quocient CD57/CD16 en els pacients amb LLC-B observen que l'augment de limfòcits CD57 és més acusat, produint un increment en el quocient respecte dels individus sans. Un aspecte interessant del treball d'aquests autors és l'anàlisi de les poblacions limfocitàries en uns pacients afectats de "limfocitosi B monoclonal de significat indeterminat". Aquest grup de pacients té unes característiques clínico-biològiques que permeten equiparar-los a la LLC-B quiescent. En aquest grup de malalts també existeix un increment dels limfòcits CD4, CD8, CD16 i CD57 respecte dels controls. No obstant, l'increment de CD8 no és tant acusat, traduint-se en un quocient CD4/CD8 normal. Pel que fa referència a les poblacions NK, l'increment dels limfòcits CD16 és molt més acusat, provocant una disminució del quocient per sota de la unitat i sent significativament diferent dels controls i dels pacients amb LLC-B, en els que el cocient és més elevat que en el grup control. Les diferències en la distribució de les poblacions limfocitàries observades entre el grup de LLC-B i els pacients **inclosos** sota la denominació de "limfocitosi B monoclonal de significat **no determinat**" pot contribuir a la diferent evolució clínica dels dos grups de pacients.



## ALTRES ESTUDIS RELATIUS A LES CNK EN PACIENTS AMB LLC-B

### A. Hipogammaglobulinèmia

Kay *et al* (1983) van estudiar l'efecte dels LGG de pacients amb LLC-B sobre la síntesi d'Ig i la proliferació dels limfòcits B d'individus controls. Els LGG dels pacients van tenir dos comportaments sobre la població normal: un grup (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) va induir supressió en la síntesi d'Ig i un segon grup (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) no va induir la supressió en la síntesi. Els LGG amb efectes negatius en la síntesi d'Ig s'havien obtingut de malalts amb hipogammaglobulinèmia, mentre que els no inductors van ser obtinguts de malalts sense aquesta alteració. Per tant, sembla clar que en un grup de pacients amb LLC-B existeix una població que exerceix un efecte supressor sobre la població B normal residual, la qual cosa pot conduir a la hipogammaglobulinèmia.

En un estudi practicat sobre 41 pacients diagnosticats *de novo*, Apostolopoulos *et al* (1981) correlacionen la hipogammaglobulinèmia amb el quocient CD4/CD8 (amb una xifra discriminativa de 1,1) sense que l'estadi de la malaltia influeixi en la presència de la hipogammaglobulinèmia.

### B. Regulació de l'ANK pels limfòcits B neoplàsics

Recentment, Burton *et al* (1984) han estudiat l'efecte de possibles productes sintetitzats pels limfòcits leucèmics de pacients amb LLC-B sobre la funció T i NK de controls. El sobrenedant obtingut després de cultivar durant 24-48 hores els limfòcits B de la LLC-B va ser utilitzat en estudis funcionals de limfòcits T i NK. El sobrenedant induïa una disminució en la proliferació, en la producció d'IL-2 i en l'estimulació per entrar en cicle cel·lular provocat per la PHA. A més d'alterar les funcions T, inhibeix l'ANK. Aquest efecte inhibitori no **s'observa** amb el sobrenedant de cultius de limfòcits B normals ni d'**altres** línies B. La molècula o molècules responsables no es coneixen **encara, però sembla** que tenen un pes inferior als 5000 daltons i estructura bioquímica de gangliòsid (131).

### C. Reconeixement del limfòcit B neoplàsic per la CNK

La sensibilitat dels limfòcits B de la LLC-B a la lisi és controvertida. Pattengale *et al* (1981) van delimitar un grup de pacients amb cèl·lules leucèmiques sensibles a les CNK. Khonina *et al* (1981) van delimitar dues poblacions de LGG, una de les quals es capaç de lisar els limfòcits B neoplàsics de la LLC-B. En canvi, Spitz *et al* (1981) van utilitzar els limfòcits de 37 pacients amb LLC-B i tots van ser resistents a la lisi NK. El tractament dels limfòcits amb èsters de forbol o neuraminidasa no els torna sensibles a la lisi NK com ho fa amb altres cèl·lules neoplàsiques. En canvi, el tractament amb anti-IgM o amb pepsina converteix els limfòcits de la LLC-B en NK sensibles, mentre que aquest efecte no s'observa en els limfòcits B normals. Els autors conclouen que en els limfòcits de la LLC-B existeixen de forma críptica estructures pel reconeixement de la CNK.

### D. Resposta als estimuladors de l'ANK

Els estudis duts a terme en pacients amb LLC-B han inclòs assaigs que valoren la resposta obtinguda després de la incubació amb agents estimuladors de l'ANK. Els resultats no són plenament concordants. Si bé els autors que han analitzat l'efecte de la IL-2 estan d'acord en l'efecte potenciador que s'obté sobre l'ANK dels pacients (1981, 1982), l'efecte produït per l'IFN és més variat. Uns autors no troben milloria de l'ANK amb aquest agent (1981, 1982); altres observen resposta només en un grup de pacients (1981), i un darrer grup constata una milloria després de la incubació amb IFN (1982, 1983, 1984).

### E. Neoplàsies secundàries

La incidència de neoplàsies sòlides en els pacients amb LLC-B és més elevada que la que presenta la població control. Aquest increment s'observa tant en neoplàsies cutànies com en altres tipus de tumors malignes (1980, 1987). No es coneix la causa que provoca una major aparició de neoplàsies en aquests malats. L'efecte del tractament alquilant i l'estat

d'immunodepressió que comporta la malaltia s'han involucrat en l'augment de segones neoplàsies [10]. Degut al seu paper funcional en l'organisme, la presència d'una citotoxicitat disminuïda en els pacients amb LLC-B s'ha relacionat, a nivell teòric, amb el desenvolupament de neoplàsies sòlides i, àdhuc, amb l'aparició de la mateixa malaltia [11].

#### F. Infeccions

El grup d'Apostolopoulos *et al* [12], aprofitant l'elevat nombre de pacients amb LLC-B en estadis avançats que inclou el seu estudi, analitzen la influència dels paràmetres immunològics i la freqüència d'infeccions. Entre els pacients en estadi B i C delimiten dos grups segons el nombre d'infeccions respiratòries anuals que necessiten d'antibioteràpia. Comparen els nivells de gammaglobulines i poblacions limfocitàries del grup amb un nombre d'infeccions superior a 5 per any amb el grup amb menor nombre d'infeccions. L'anàlisi univariada dona com paràmetres amb significació sobre les infeccions la xifra de gammaglobulines, el percentatge de limfòcits CD16 i el quocient CD4/CD8. L'anàlisi multivariada suggereix que els paràmetres amb major poder discriminatiu són el percentatge de CD16 i el quocient CD4/CD8. Per tant, la determinació de les poblacions T i NK en el moment del diagnòstic pot permetre delimitar el grup de pacients amb més risc de presentar complicacions infeccioses en l'evolució.

## OBJECTIUS

Les cèl·lules natural killer acompleixen dintre de l'organisme múltiples funcions immunorreguladores. Controlen l'aparició de neoplàsies; actuen com mecanisme de defensa contra les infeccions i regulen les funcions de limfòcits B i T així com altres cèl·lules hemopoètiques. A la leucèmia limfàtica crònica existeix una important alteració immunològica que afecta els limfòcits B, T i NK. Els estudis sobre ANK a la LLC-B són, en general, *in vitro* sense que s'analitzin les característiques clíniques dels malalts. Si bé existeix consens en l'alteració de l'ANK en aquest tipus de malalt, no s'ha investigat la localització del defecte ni el seu significat pronòstic.

Els objectius de la present tesi doctoral són determinar:

1. l'efecte dels limfòcits B a l'ANK
2. l'activitat *natural killer* en pacients amb LLC-B.
3. les relacions entre l'ANK i les característiques dels malalts
4. la influència de l'ANK en la supervivència o progressió de la malaltia
5. l'evolució de l'ANK en el transcurs de la malaltia i la influència de l'administració de tractament alquilant o immunomodulador.
6. les poblacions NK i T en els malalts amb LLC-B
7. la relació entre les poblacions limfocitàries i les característiques dels pacients
8. la relació entre l'ANK i les poblacions limfocitàries.

## PACIENTS

En l'estudi s'han inclòs pacients diagnosticats de LLC-B i controlats a l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Els criteris diagnòstics utilitzats són els definits per l'*International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia* [1].

De cada pacient s'ha recollit la informació clínica que se cita a continuació:

1. Edat i sexe
2. Data de diagnòstic de la LLC-B i càlcul de l'interval entre el diagnòstic i la realització de l'estudi de citotoxicitat.
3. Dades clíniques a l'inici de la malaltia incloent-hi:
  - exploració física: adenomegàlies i nombre de territoris, hepatomegàlia, esplenomegàlia i altres infiltracions
  - estadi clínic segons la classificació de Rai [2]
  - estadi clínic segons la classificació de Binet [3]
4. Dades analítiques a l'inici de la malaltia:
  - valors hemoperifèrics: leucòcits totals i recompte diferencial, xifra d'hemoglobina, hematòcrit, VCM, recompte de plaquetes.
  - bioquímica: funció renal, hepàtica, LDH, proteïnes totals i proteïnograma.
  - dosificació d'immunoglobulines
5. Exploracions complementàries:
  - grau d'infiltració limfocitària en el mielograma
  - patró d'infiltració medullar [4]
  - tipus de cadena lleugera expressada pels limfòcits

## 6. Càlcul del temps de duplicació limfocitari (TDL).

El TDL es va calcular en tots els pacients dels que es disposava com a mínim de 3 hemogrames en un període mínim de 3 mesos sense rebre cap tipus de tractament. El càlcul es va realitzar per mètode de regressió lineal (20).

## 7. Dades evolutives:

- Data de l'última visita
- Data i causa de l'èxitus
- progressió de la malaltia (limfòcits  $>50 \times 10^9 / L$ ) i canvis d'estadi
- tractament i tipus d'aplicació (terapèutic o protocolitzat). Es va considerar que el malalt no rebia tractament en el moment de l'estudi de l'activitat NK si en les sis setmanes prèvies a l'estudi no havia rebut cap mena de tractament.
- protocol clorambucil-interferó: durant el període de realització de la present tesi es va desenvolupar al Servei d'Hematologia un protocol terapèutic per malalts en estadi A no tractats prèviament que consistia en CLB a dosi de 0,4 mg/Kg els primers dos dies de cada quinzena fins obtenir una xifra de limfòcits inferior a  $10 \times 10^9 / L$  o realitzar un màxim de 6 mesos de tractament. Un cop aconseguida la reducció de la massa tumoral s'inicia el tractament immunomodulador amb  $\alpha_2$ -interferó a dosi de  $3 \times 10^6$  U per via subcutània tres cops a la setmana durant un període mínim de 4 mesos i màxim de 12 mesos.

## 8. Dades en el moment de realitzar l'estudi de citotoxicitat i de poblacions limfocitàries:

- estadi clínic de Rai
- estadi clínic de Binet
- dades exploratòries
- realització i tipus de tractament
- valors hemoperifèrics
- dosificació d'immunoglobulines (període  $\pm 1$  any de la data de l'estudi).

## METODES

### 1. RECOMPTE DE LIMFOCITS GRANS GRANULATS A SANG PERIFERICA

MATERIAL: # Portes

# Solució de May-Grünwald (pur i al 50%) (Merck<sup>R</sup>)

# Solució de Giemsa (al 10%) (Fluka<sup>R</sup>)

# Aigua destil·lada

# Cronòmetre

# Microscopi òptic (Olympus BH-2)

# Comptador cel·lular (Clay Adams, Counter)

# Autoanalitzador Technicon H1

De cada pacient o control inclòs en l'estudi es va obtenir una extensió de sang perifèrica directa que es va tenyir amb May-Gründwald-Giemsa (388). Es va fer el recompte leucocitari diferencial habitual i el de LGG sobre 100 limfòcits en els controls i sobre 200 limfòcits en els pacients. Es van considerar LGG aquells limfòcits de tamany més gran i citoplasma més ampli que la resta de limfòcits i que contenien grànuls atzuròfils (3-4 com a mínim).

De la mateixa venopunció es va extreure sang per determinar els paràmetres hematològics bàsics, per l'estudi de les poblacions limfocitàries i l'activitat *natural killer*. Els paràmetres hematològics bàsics es van realitzar de forma automatitzada en un autoanalitzador H1 (Technicon<sup>R</sup>).

### 2. DETERMINACIO DE L'ACTIVITAT NATURAL KILLER

#### A. Manteniment de la línia cel·lular diana (389)

La línia diana emprada (K562) prové d'una crisi **blàstica** de LMC i és altament sensible a la lisi NK. El servei d'immunologia de l'hospital Clínic va cedir la línia diana, que es va mantenir en cultiu durant tot l'estudi.

1. MATERIAL: # Línia eritroleucèmica K562
  - # RPMI 1640 (Eurobio<sup>R</sup>)
  - # Sèrum fetal boví (Gibco<sup>R</sup>)
  - # L-glutamina (Gibco<sup>R</sup>)
  - # Heppes buffer (Flow Laboratories<sup>R</sup>)
  - # Gentamicina (Normon<sup>R</sup>)
  - # Pipetes estèrils (Corning)
  - # Flascons de cultiu 25 cm<sup>2</sup> (Nuncion<sup>R</sup>, Nunc, InterMed)
  - # Campana de flux laminar (Telstar)
  - # Incubador de CO<sub>2</sub> humidificat (ASSAB, Medicin AB)
  - # Filtres de 0,22 µm (Millex-GS<sup>R</sup>, Millipore)
  - # Tubs de criocongelació (Nunc, InterMed)
  - # DMSO (Merck<sup>R</sup>)
  - # Bany Maria (37° i 56°)
  - # Material de vidre estèril
  - # Microscopi de llum invertida (Olympus Tokyo)
  - # Agitador mecànic (Atomixer<sup>R</sup>, Atom)

2. SOLUCIONS:

- # Medi de cultiu: RPMI 1640, 10% sèrum fetal boví descomplementat durant 35' a 56°, 1% L-glutamina, 2,5% heppes buffer, 400 µg/mL de gentamicina.  
El medi de cultiu és conservat en ampolles de vidre estèrils i és manté a -20°C fins la seva utilització.
- # Solució de congelació: DMSO al 10% en tampó fosfat.

Aquestes solucions s'esterilitzaven en el flux de la campana fent-los passar a través de filtres de 0,22 µm de porus.

3. METODE:

La línia K562 era mantinguda en flascons de cultiu a l'incubador de CO<sub>2</sub> (37° i 100% humidificació) en medi de cultiu. Quan s'observava sobrecreixement cel·lular o acidificació del medi es procedia al reajustament de la cel·lularitat. Els canvis es realitzaven



amb una periodicitat semisetmanal.

De forma periòdica (quinzenal o mensual) es congelava part de la cel·lularitat diana. El procediment de congelació **consisteix** en afegir un volum igual de la solució de DMSO al 10% (a 4°C) en agitació contínua i gota a gota sobre les cèl·lules K562 resuspeses en medi de cultiu fred. La barreja es col·loca en tubs de criocongelació i, ràpidament, es guarda en un congelador a -80°C.

Quan existia sobrecreixement bacterià es tirava el flascó contaminat i es descongelava part de la cel·lularitat emmagatzemada.

## B. OBTENCIO DE LA CMN EFECTORA

1. MATERIAL: # PBS (150 mmol/L; pH 7.2) (Biomerieux<sup>R</sup>)  
# Ficoll-Paque (Pharmacia<sup>R</sup>)  
# Pipetes ajustables  
# Tubs de 10 mL  
# Centrífuga (Jouan CR 1000)  
# Càmara de Neubauer  
# Aigua destil·lada
2. SOLUCIONS: # Tampó fosfat: s'obtenia de la dissolució de les sals en 1 litre d'aigua destil·lada. La solució és estable a 4°C.
3. METODEDE:

La sang heparinitzada es dilueix 1:1 - 1:3 en tampó fosfat. Posteriorment, en tubs de 10 mL, es col·loca amb molta cura la sang diluïda sobre el ficoll (7mL: 3mL) sense alterar el gradient de densitat. Se centrifuguen els tubs a 2000 rpm durant 20 minuts i se separa la interfase cel·lular mononucleada. La CMN **es renta** en tres ocasions amb tampó fosfat i es calcula la **cel·lularitat total** per recompte en càmara de Neubauer (388).

## C. TECNICA DE CITOTOXICITAT (389)

1. MATERIAL: # Línia K562
  - # CMN efectora
  - # Plaques de 96 pous (Microtiter<sup>R</sup>, Nunc, InterMed)
  - # Centrífuga per plaques (LabofugeGL<sup>R</sup>, Heraeus Christ)
  - # Tampó fosfat (descriu a l'apartat B)
  - # Medi de cultiu (descriu a l'apartat A)
  - # Pipetes ajustables
  - # Tubs de plàstic
  - # Càmara de Neubauer
  - # Estufa d'incubació (ASSAB)
  - # Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (Amersham)
  - # Nonidet P-40 (Fluka<sup>R</sup>)
  - # Tritó X-100 (Merck<sup>R</sup>)
  - # Comptador de radiacions gamma (Packard 800-C)
  
2. SOLUCIONS: # Medi de cultiu (descriu en l'apartat A)
  - # Tampó fosfat (descriu en l'apartat B)
  - # Nonidete P-40 al 10%
  - # Tritó X-100 al 10%
  
3. METODE:

L'ANK és la citotoxicitat mediada per limfòcits contra determinades cèl·lules diana sense participació de memòria immune. Per quantificar la citotoxicitat produïda en les cèl·lules diana es necessita un procediment que ens diferenciï les dianes mortes de les vives. El procediment més emprat és el marcatge de les cèl·lules diana amb un isòtop radiactiu que s'incorpora al citoplasma i s'allibera quan es produeix la mort cel·lular.

## 1. Línia cel·lular diana

Dels flascons de cultiu s'agafa una mostra **pel càlcul** de la cel·lularitat per mL. Un cop coneguda la **concentració cel·lular**, s'extreu el volum necessari per obtenir  $2 \times 10^6$  cèl·lules. Se centrifuga la suspensió cel·lular (10' a 2000 rpm) per extreure el volum sobrant.

## 2. Cèl·lules efectores

La CMN obtinguda segons l'apartat B es resuspèn en medi de cultiu i s'ajusta a la concentració adequada per realitzar les proporcions D:E necessàries.

## 3. Tècnica de citotoxicitat

### A. Marcatge de la línia diana amb $^{51}\text{Cr}$

Els  $2 \times 10^6$  de cèl·lules diana es resuspenen en 100  $\mu\text{L}$  de medi de cultiu. S'afegeixen 100  $\mu\text{Ci}$  de cromat sòdic ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ , Amersham, UK) i s'incuben durant 60 minuts a  $37^\circ\text{C}$  agitant suaument cada 15 minuts. Després de la incubació amb l'isòtop es renten les cèl·lules amb tampó fosfat (50 mL) en 3 ocasions per arrossegar el crom no lligat. Finalment, es resuspèn el botó cel·lular en 40 mL de medi de cultiu per aconseguir una concentració de  $5 \times 10^4$  cèl·lules per mL. Es deixa reposar la línia diana uns 15-30 minuts abans de montar la placa.

### B. Proporcions diana:efectora

Depenent de la CMN total obtinguda dels pacients o controls a testar s'adequava la suspensió a la màxima proporció D:E possible sense superar 1:800. De cada mostra a estudi es van realitzar com a mínim 4 proporcions D:E. Les proporcions D:E s'obtenen per dilució de la concentració cel·lular prèvia amb un volum igual de medi de cultiu per obtenir una proporció meitat de l'original.

### C. Muntatge de la placa

Un cop realitzades les dilucions de la mostra a estudi, i completat el procés de marcatge de la línia diana, es procedia al seu enfrontament en plaques de 96 pous en "U". Cada proporció es testava per triplicat col·locant a cada pou 100  $\mu\text{L}$  de la suspensió

diana i 100 µL de la mostra a estudi. Per obtenir l'alliberament espontani de  $^{51}\text{Cr}$  durant el període de realització de l'assaig s'incuben 100 µL de la suspensió diana amb 100 µL de medi de cultiu. En canvi, per conèixer l'alliberament màxim de l'isòtop s'incuba la suspensió diana amb 100 µL d'una solució detergent (Nonidet P-40 al 10 % ó Trito X-100 al 10%). Cada estudi inclou la CMN d'un control o donant d'ANK coneguda.

Quan s'han distribuït totes les mostres es col·loca la placa en un incubador humidificat de  $\text{CO}_2$  durant un període de 4 hores, o 20 hores, segons la modificació descrita per Zaretskaya *et al* (209). Posteriorment, se centrifuga la placa durant 10 minuts a 2000 rpm per deixar el sobrenedant lliure de cèl·lules. Amb molta cura de no recollir el botó cel·lular, s'obtenen 100 µL de sobrenedant que es col·loquen en tubs i es mesura la radioactivitat de cadascun d'ells durant un període de 60 segons en un comptador de radiacions gamma (Packard 800-C).

#### D. Càlcul dels resultats

Per obtenir els valors de citotoxicitat de cada proporció D:E s'aplicava la fórmula següent:

$$\text{ANK (\%)} = \frac{(\mu \text{ Experimental} - \mu \text{ Espontani})}{(\mu \text{ Màxim} - \mu \text{ Espontani})} \times 100$$

$\mu =$  mitja dels valors

S'excloïen del càlcul de la mitjana aquells valors que s'allunyaven de la mateixa  $\pm 20$  %. Posteriorment els valors de citotoxicitat experimental s'ajustaven a una corba sigmoide de tipus von Krogh com es descriu a l'apartat 5.F.C.

### 3. POBLACIONS LIMFOCITARIES

- A. MATERIAL: # PBS (Biomerieux<sup>®</sup>)  
 # Pipetes ajustables  
 # Tubs de plàstic

- # NaN<sub>3</sub> (Merck<sup>R</sup>)
- # Sèrum humà AB
- # Albúmina bovina (Sigma<sup>R</sup>)
- # Centrífuga (Jouan CR 1000)
- # Citofluoròmetre de flux (FACScan<sup>R</sup>, Becton Dickinson)
- # Anticossos monoclonals (descrits posteriorment)
- # Calibrite<sup>R</sup> (Becton Dickinson)

B. SOLUCIONS: # Solució de rentat: tampó fosfat (pH 7,2), 0,2% NaN<sub>3</sub>, 0,2% albúmina bovina, 2% sèrum humà AB descomplementat d'home.

C. METODEDE: (390)

Part de la CMN del pacient o control es reservava per l'estudi dels antigens de superfície mitjançant tècnica d'immunofluorescència directa. La immunofluorescència posa de manifest la presència i ens permet contabilitzar el nombre de cèl·lules que expressen un determinat antigen. Per posar de manifest l'antigen necessitem un AcMo o policlonal que el reconegui. Actualment existeixen un gran nombre d'AcMo comercialitzats que estan dirigits contra molècules molt ben definides. En segon lloc es necessita un fluorocrom que ens reveli la reacció. L'aplicació del fluorocrom pot ser un segon pas (tècnica d'immunofluorescència indirecta) després de la incubació amb l'AcMo primari, o bé pot estar conjugat amb l'AcMo específic (tècnica directa). La tècnica directa és més curta i permet amb molta facilitat la realització de dobles marcatges.

El nombre de fluorocroms aptes per tècniques d'immunofluorescència ha augmentat amb el temps, si bé l'elecció dels fluorocroms depèn de les característiques de l'aparell en el que es realitzi la lectura.

#### 1. Anticossos monoclonals, especificitat i fluorocroms

Els AcMo emprats es van obtenir de la marca Becton-Dickinson. Mitjançant els AcMo es va analitzar la presència d'antigens pan-B (CD19), pan-T (CD2) i de subpoblacions

limfocitàries T (CD4, CD8) i NK (CD16, CD57, CD11b i CD56). Els AcMo estaven conjugats a fluorocroms: fluoresceïna (FITC) o ficoeritrina (PE). La longitud d'ona que excita ambdós fluorocroms és similar, però el seu espectre d'emissió és diferent. La diferència en l'ona d'emissió permet la utilització conjunta de dos AcMo diferents lligats cadascun a un fluorocrom, i diferenciar les cèl·lules positives per algun dels dos o per tots dos. D'aquesta manera es va analitzar la presència global de cada antigen i la coexpressió entre alguns d'ells. Les característiques dels AcMo utilitzats s'especifiquen en la taula 5.D.1.

Les combinacions de monoclonals que es van realitzar per l'anàlisi de la coexpressió d'antígens en la CMN de controls i pacients va ser:

CD4-FITC/CD16-PE	
CD8-FITC/CD16-FITC	FITC= fluoresceïna
CD57-FITC/CD16-PE	PE= ficoeritrina
CD2-FITC/CD11b-PE	
CD2-FITC/CD56-PE	

## 2. Tècnica d'immunofluorescència directa.

Cada mostra a estudi es va ajustar a una concentració de  $5 \times 10^6$  cèl·lules/mL. En tubs convenientment retolats es dipositen 100  $\mu$ L de la suspensió, s'afegeix 2 mL de solució de rentat (PBS + 0,2% d'albumina bovina + 0,2% d'azida sòdica en els tubs que s'incuben amb CD16) i se centrifuguen durant 7 minuts a 2000 rpm. Es decanta el sobrenedant i es resuspèn el botó en 50  $\mu$ L de la solució de rentat. Al tub corresponent s'afegeix la quantitat necessària d'AcMo (segons indicacions de la casa comercial) barrejant bé amb la suspensió cel·lular, i s'incuba durant trenta minuts a 4°C protegit de la llum. En un altre tub s'afegeix un monoclonal irrelevant conjugat al fluorocrom emprat en els estudis (tub control). Després es renta tres vegades amb la solució de rentat i les mostres estan a punt per la lectura.

### 3. Lectura i interpretació dels resultats

#### A. Citofluorometria de flux (391)

La lectura de les mostres es va realitzar en un citofluoròmetre de flux (FACScan<sup>®</sup>, Becton-Dickinson). De forma esquemàtica, els citofluoròmetres de flux analitzen partícules en suspensió que, previ a la intersecció amb una font de llum, disposen de forma unicel·lar en un flux hídric. La intersecció de la partícula amb la font de llum produeix una alteració en la llum emesa:

- 1). A l'intercedir la suspensió unicel·lular de forma perpendicular a la llum es produeix un tall en el flux de llum des del lloc on hi incideix la cèl·lula. La intensitat de la llum posterior a la cèl·lula és proporcional al seu tamany. El detector que recull la senyal de tamany està col·locat a 0° de la direcció de la font de llum.
- 2). La llum que incideix sobre la cèl·lula és reflectida en totes direccions i pot canviar de longitud d'ona. La llum reflectida és recollida a 90° de la direcció de la font de llum.
- 3). Si la cèl·lula està lligada a algun fluorocrom, al passar pel feix de llum s'excita i emet llum en una altra longitud d'ona. L'emissió de llum és proporcional a la quantitat de fluorocrom que presenta la cèl·lula. La senyal de fluorescències es recull a 90°.

Després de recollits els senyals lumínics en els detectors de 0° i 90°; atravessen una sèrie de lents òptiques que permeten el pas de: i) la longitud d'ona més propera a la de la font de llum (488 nm) i, ii) al màxim d'emissió dels fluorocroms (535 nm i 585nm). El senyal filtrat arriba als detectors, que transformen l'energia lumínica en elèctrica i després la tradueixen a un llenguatge **apte per a ser processat per ordinador**.

## B. Característiques de l'aparell

El citofluoròmetre emprat utilitza un làser d'argó com font de llum amb una potència de 15 mW que emet a 488nm. Poseeix un sistema de lents que produeixen un feix el·líptic de llum. La longitud lumínica arriba al detector, es fotomultiplica la seva potència, es converteix el senyal lumínic en elèctric i després en digital pel seu processament informàtic. La llum emesa per les partícules és seleccionada abans d'arribar als detectors per una sèrie de filtres de banda de 530 nm (fluoresceïna), 585 nm (ficoeritrina) i >650 nm (vermell Texas).

La velocitat de pas de la mostra a través del feix de llum làser és de 6 m/s, podent ser analitzat un volum de 60 µL o 12 µL per unitat de temps.

La sensibilitat de l'aparell permet detectar la presència de 1000 molècules per partícula.

El suport informàtic recau en una computadora Hewlett-Packard (HP9000, model 310) amb 1 Mbyte de memòria RAM. Les mostres s'emmagatzemen en un HP model 9133H de 20 Mbytes de capacitat o en disquets removibles de 720 Kbytes.

## C. Interpretació dels resultats.

Abans de l'adquisició de les mostres es calibra el citofluoròmetre. La calibració situa els detectors i els amplificadors de la senyal en la situació òptima per cadascun dels paràmetres i compensa la senyal rebuda en els canals de fluorescència per evitar falsos dobles positius, ja que els espectres d'emissió de la fluoresceïna i ficoeritrina se superposen en certes longituds d'ona que no són bloquejades pel sistema de lents òptiques (figura 5.D.1). Per la calibració s'utilitzen: i) partícules sense fluorocrom per localitzar els senyals de tamany i complexitat i ii) partícules lligades a cadascun dels fluorocroms per situar els senyals de fluorescència



i compensar de forma electrònica l'aparició de falsos dobles positius (Calibrite<sup>R</sup> i Autocomp<sup>F</sup>, Becton-Dickinson). Un cop està calibrat l'aparell, es poden passar totes les mostres a estudiar.

Per valorar la positivitat de les mostres que s'han incubat amb AcMo específics s'ha de conèixer primer el senyal que ha produït el control negatiu. Es considera positiu tot senyal que supera el màxim senyal obtingut en el control (figura 5.D.2a). Per l'estudi de coexpressió d'antígens el sistema d'anàlisi és similar, però és un estudi biparamètric (fluorescència 1 vs fluorescència 2) (figura 5.D.2b).

El càlcul del percentatge de cèl·lules positives per cadascun dels AcMo de la mostra el realitza el software informàtic.

#### D. Coexpressió d'antígens en CNK.

L'expressió dels antígens CD4, CD8, CD57 i CD2 per part dels limfòcits NK, definits per la presència de CD16, CD11b o CD56, es va analitzar de forma específica. Atés el baix percentatge de cèl·lules positives per antígens NK en els pacients amb LLC-B, es va fer una anàlisi selectiva de les mateixes. La suspensió cel·lular marcada amb la combinació d'AcMo s'analitza en un primer pas per localitzar les cèl·lules NK i, gràcies al suport informàtic del citòmetre, adquirir únicament els limfòcits amb antígens NK. De cada mostra es va adquirir com a mínim 500 cèl·lules positives pel marcador NK de cadascuna de les combinacions d'AcMo realitzades.

## 4. PURIFICACIO DE LIMFOCITS B

Per valorar l'efecte dels limfòcits B en l'ANK es van dissenyar assaigs amb proporcions conegudes de limfòcits B **purificats**.

- A. MATERIAL: # PBS (Biomerieux<sup>F</sup>)  
 # Fibra de nylon  
 # Xeringues de plàstic 5 mL (Becton-Dickinson<sup>R</sup>)

- # Medi de cultiu (descriu en l'apartat A)
- # HCl 0,2 N (Merck<sup>®</sup>)
- # Aigua destil·lada
- # Bany maria
- # Parafilm
- # Estufa de 37°C
- # Tubs i placa de Petri
- # Balança

B. MÈTODE (352):

1. Obtenció de la CMN de la forma descrita en l'apartat B i ajustament a una concentració de  $50 \times 10^6$ /mL
2. Preparació de la fibra de nylon. Es col·loquen 300 mg de fibra dintre de la xeringa. Es renta deu vegades alternant 10 mL de HCl 0,2N i 10 mL d'aigua destil·lada. Aclarir amb 5 passades de 10 mL de medi de cultiu calent (37°C). Tapar els dos extrems amb parafilm i incubar durant 30 minuts a 37°C.
3. Incubació dels limfòcits. Destapar els dos extrems de la xeringa i premsar la fibra de nylon amb l'èmbol fins que ocupi un volum de 2,5 mL. Tapar l'extrem inferior i col·locar gota a gota la suspensió de CMN deixant impregnar tota la fibra. Tapar l'extrem superior amb parafilm i deixar-lo incubar en posició vertical durant 30 minuts en l'estufa.
4. Recollida dels limfòcits. Destapar els dos extrems de la xeringa i eluir els limfòcits T afegint gota a gota medi de cultiu calent (10mL). Recollir els limfòcits en un tub i conservar-los a la nevera. Rentar la fibra de nylon amb 50 mL de medi de cultiu calent. Col·locar 15 mL de medi de cultiu fred (4°C) en un placa de Petri. **Connectar** l'èmbol de la xeringa i fer repetides aspiracions del **medi de cultiu fred** sense agafar més d'un mL de medi en cadascuna **de les aspiracions**. Recollir la suspensió de limfòcits B de la placa de Petri. La puresa de la població va ser superior al 90%.

## 5. METODEDES ESTADÍSTICS

### A. ESTRATEGIA DE L'ESTUDI

En primer lloc s'ha procedit a l'estandarització de la tècnica. Els resultats de citotoxicitat experimental s'han analitzat respecte de la reproductibilitat intrassaig i interassaig. La transformació dels valors experimentals en teòrics per ajustament a una corba sigmoide de tipus von Krogh ha motivat l'anàlisi de la bondat de l'ajustament obtingut emprant els residuals d'ajustament proporcionats pel programa de càlcul i la prova de  $\chi^2$  pels valors observats i esperats (experimentals i teòrics). Així mateix s'ha efectuat la repetició de l'estudi de reproductibilitat intrassaig i interassaig pels valors teòrics. Per tots aquests estudis s'han utilitzat les proves descrites a l'apartat F.2.B i F.2.C.

Posteriorment s'ha analitzat l'efecte dels limfòcits B purificats sobre l'ANK. Els valors experimentals i teòrics d'ANK obtinguts de les mostres s'ha correlacionat amb la proporció de limfòcits B afegits, comprovant el seu ajustament a diverses corbes (exponencial, lineal, potencial, logarítmica). S'ha triat el model d'ajustament més adient.

Respecte de les dades dels malalts que componen la present tesi doctoral, l'estudi estadístic s'ha dividit en diversos punts:

#### 1. Sèrie global

En aquest apartat s'han inclòs tots els pacients amb LLC-B als que s'ha realitzat l'assaig de citotoxicitat. En aquells malalts en els que la citotoxicitat s'ha realitzat en més d'una ocasió, s'han inclòs les característiques clínic-analítiques del **primer estudi**.

En primer lloc, dels malalts sotmesos a **estudi s'ha** fet la descripció de les característiques clíniques i analítiques en el moment del diagnòstic de la malaltia i en el moment de realitzar la

citotoxicitat (organomegàlies, estadis clínics i la pertinença al subgrup de malalts amb LLC-B quiescent, xifra de limfòcits, hemoglobina i plaquetes, etc.). També s'ha fet **una estadística descriptiva** dels valors de citotoxicitat, experimental i **teòrica**, de les poblacions limfocitàries, en valor percentual i **absolut**, dels quocients limfocitaris i de les poblacions definides per dos antigens de superfície. Per aquests estudis descriptius es van utilitzar les proves estadístiques de l'apartat d'estadística descriptiva.

En una segona part s'han efectuat estudis evolutius valorant la supervivència actuarial dels malalts i la progressió de la malaltia considerant l'aparició de limfocitosi superior a  $50 \times 10^9/L$  i els canvis a estadi clínic superior. La metodologia emprada es recull a l'apartat 5.F.2.D.3.

En tercer lloc es va realitzar un estudi comparatiu dels valors de citotoxicitat i poblacions limfocitàries dels malalts amb LLC-B amb els valors dels controls mitjançant els test paramètrics descrits en l'apartat d'estadística inferencial.

En quart lloc es van analitzar les característiques clíniques i analítiques, tant inicials al diagnòstic de la malaltia com en el moment de l'estudi, que tenien relació amb la citotoxicitat desenvolupada pels malalts i les poblacions limfocitàries. S'han fet servir les proves descrites en l'apartat d'estadística inferencial. En aquest apartat s'ha analitzat també la relació entre la citotoxicitat i els valors de les poblacions limfocitàries.

L'estudi s'ha repetit incloent-hi únicament com univers els pacients no tractats prèviament.

Finalment, per tal d'avaluar el valor pronòstic **de l'ANK** i les poblacions limfocitàries s'ha realitzat un estudi **predictiu** de la supervivència i la progressió de la malaltia tal **com es descriu** en l'apartat 5.F.2.E.c. Inicialment es va fer un estudi univariat, i les variables que van resultar significatives o indiciàries de significació

(amb un risc comprés entre 0,05 i 0,1) es van incloure en models multivariats adequats conjuntament amb altres variables que es van considerar clínicament rellevants en relació amb el descrit a la literatura. Es va justificar la necessitat de restringir el nombre de paràmetres avaluats en el desig de conservar la parsimònia del model i disminuir el risc  $\alpha$  de primera espècie. S'han considerat dos moments diferents per valorar els paràmetres amb efecte sobre la supervivència i la progressió: la data del diagnòstic i la data de la inclusió en l'estudi.

## 2. Comportament de la citotoxicitat en incubacions prolongades

Per valorar la capacitat de reciclatge de les CNK es va perllongar el període d'incubació tal com proposa la bibliografia.

En primer terme es va fer un estudi de la estandarització tal com es descriu a l'apartat B, i una descripció dels valors de citotoxicitat obtinguts en controls.

Els valors de citotoxicitat a 20 hores d'incubació s'han comparat amb els obtinguts a 4 hores mitjançant les proves descrites en l'apartat 5.F.2.E.a.

En tercer lloc s'han comparat les variables clíniques i analítiques d'aquest grup de pacients respecte de la població que compon la sèrie global, per conèixer si aquest grup de pacients és representatiu de la sèrie inicial. Després s'ha estudiat la relació entre la citotoxicitat i les poblacions respecte de les variables analítiques amb significació en l'estudi realitzat a la sèrie global. Aquesta anàlisi s'ha realitzat per veure si es conserva la influència sobre l'ANK de les variables després de la incubació perllongada.

Finalment, s'han comparat els valors d'ANK a 20 hores dels pacients amb els obtinguts en controls i els obtinguts en un grup de pacients hemofílics politransfesos i infectats pel VIH en les mateixes condicions d'incubació. Aquest grup de malalts s'ha inclòs

com comparació perquè està descrit que presenten un defecte en la capacitat de reciclatge de la CNK (78).

### 3. Estudis seqüencials de citotoxicitat i poblacions limfocitàries

Aquells pacients inclosos en la sèrie inicial que van ser estudiats de nou al cap de cert temps de la seva inclusió en l'estudi componen l'univers d'aquest estudi. Per la seva anàlisi els pacients s'han agrupat com segueix:

- pacients no tractats al llarg de l'evolució
- pacients sota tractament alquilant
- pacients sota tractament immunomodulador.

Aquesta divisió s'ha realitzat per poder valorar:

- en el primer grup de pacients l'evolució natural de l'ANK en la LLC-B
- i en segon i tercer grup l'efecte que provoca la quimioteràpia sobre la citotoxicitat diferenciant dues terapèutiques de mecanisme d'acció molt diferent: un citotòxic (potencialment reductor de l'ANK) i un immunomodulador (amb conegut efecte estimulador de l'ANK *in vitro*).

Quan es disposava de les dades, s'ha valorat la relació entre l'ANK i les poblacions limfocitàries a cadascun dels grups.

Les proves estadístiques utilitzades en la realització d'aquesta tesi doctoral i els motius del seu ús es detallen a continuació. Els mètodes de càlcul estan descrits en diversos textos (393-401).

## **B. ESTANDARITZACIO DE LA TECNICA**

Per l'estandarització de la tècnica s'ha avaluat **fent servir** els estudis de reproductibilitat intrassaig, inter i global i s'han obtingut els valors de normalitat per cadascuna de les poblacions estudiades.

### 1. Reproductibilitat intrassaig

Es fa repetint varies vegades la determinació d'una **mateixa** mostra per comprobar la seva estabilitat en mesures repetides. Pel càlcul s'empra la prova d'ANOVA unidireccional (402).

### 2. Reproductibilitat interassaig

Es determina el valor del paràmetre per una mostra varies vegades i repetint novament després de parar i calibrar el sistema (en aquest cas processant la mostra en assaigs diferents). Permet comprobar l'estabilitat del resultat depenent d'alteracions aleatòries del sistema. El càlcul es fa per la prova d'ANOVA bidireccional (402).

### 3. Reproductibilitat global

Es una combinació de les dues anteriors.

## C. AJUSTAMENT A CORBES DE von KROGH

Per poder procedir al càlcul matemàtic dels resultats d'ANK els valors obtinguts en l'assaig de citotoxicitat experimental es van ajustar a una corba sigmoide de tipus von Krogh modificada (213,403) de fórmula  $f(x)=[k/(1+(ax)^{-n})]$ , on k representa la màxima citotoxicitat teòrica, x la proporció D:E, f(x) el percentatge de citotoxicitat, a és un paràmetre d'escala i n un paràmetre de forma. Aquesta família de corbes de tipus von Krogh presenta avantatges respecte de la utilització d'una corba de tipus Michaelis-Menten que ha sigut emprada per altres autors (205-206). La cinètica de Michaelis Menten només és aplicable quan les corbes són aproximadament lineals prop de l'origen. Tot i així, la pendent de la corba ha de ser determinada fent servir només aquelles proporclons D:E que provoquen una citotoxicitat baixa (en general inferior **al 25%**). Per això, l'ajustament a una cinètica de Michaelis Menten que obliga a descartar els punts d'ANK més elevats i fa que es menyspreïn part de les dades disponibles i, a més, infraestima la citotoxicitat causada per limfòcits amb

baixa activitat lítica.

L'ajustament de les dades experimentals a la corba **teòrica** de tipus von Krogh referida es va fer mitjançant l'aplicació d'un **mètode** no lineal per mínims quadrats amb resolució de l'equació aïllant la **k**, **n** i **a** fent servir el programa PAR del paquet estadístic BMDP (406). D'aquesta manera, amb un mètode de regressió no lineal, s'estalvia la transformació lineal de l'equació que obligaria a una estimació prèvia de la citotoxicitat màxima (**k**).

Els resultats de citotoxicitat s'han expressat amb el valor predit de la corba teòrica obtinguda per cada mostra quan la proporció era 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 i 1:800. L'ajustament a la corba teòrica observada es va valorar considerant:

- 1) la suma de residuals totals de l'ajustament (proporcionats pel programa PAR),
- 2) l'ajustament gràfic de la corba teòrica als valors experimentals puntuals, i
- 3) emprant la prova de  $X^2$  (per observats/esperats), on els valors observats són els valors de citotoxicitat experimentals, i els esperats són els valors teòrics calculats per cadascun dels punts experimentals i el punt equivalent de la corba.

## D. ESTADISTICA DESCRIPTIVA

### 1. Variables contínues

De les variables contínues s'ha exposat, com a mínim, una mesura de centralització i una de dispersió. Entre elles:

#### Centralització

- Mitja
- Mediana, d'aplicació especialment útil en **variables** amb una recorregut molt ampli o amb una distribució no **normal**.

#### Dispersió

- Desviació estàndard (D.S.) aplicada en **variables** amb distribució normal.



- Extremes. Permet el càlcul del recorregut i pot aplicar-se a les variables de distribució no normal.

#### Prova de normalitat

Es va utilitzar per saber si són aplicables **determinades** proves d'estadística inferencial a una variable concreta. **S'ha utilitzat** la tendència a l'agrupament homogeni al voltant d'un valor central amb l'aplicació de la prova del *Skewness*. En les variables amb lateralització s'ha aplicat la prova de Kolmogorlov-Smirnov.

## 2. Variables categòriques

Les variables categòriques s'han representat pel valor de les seves freqüències absolutes o relatives.

## 3. Fenòmens evolutius

S'han emprat en aquelles variables que succeixen de forma evolutiva en funció del temps de seguiment dels pacients.

S'han calculat utilitzant el mètode de Kaplan i Meier (397) per traçar les corbes actuàries de la sèrie global i dels subgrups de malalts. A l'eix d'abscises es representa el temps transcorregut i a l'eix d'ordenades la probabilitat acumulada de no que no hagi ocorregut el fenomen estudiat. Els pacients en els que no ha succeït el fenomen són pacients "censurats", però que aporten la seva informació al ser inclosos en l'estudi. Aquestes corbes s'han representat mitjançant gràfiques actuàries esglaonades. Les corbes actuàries s'acompanyen dels valors numèrics de: i) la mediana o temps que es requereix per a que el fenomen es produeixi en el 50% de la població estudiada, i ii) de la probabilitat actuària instantània i de la seva variància i de l'interval de confiança d'aquesta probabilitat (amb un risc unilateral de 0,05).

En aquest estudi s'ha valorat com fenomen evolutiu i) la mort del pacient, ii) la progressió de la xifra de limfòcits fins **superar els  $50 \times 10^9/L$**  i iii) el pas a un estadi clínic superior. En el cas de la limfocitosi es van excloure tots aquells malalts que havien presentat uns recomptes

superiors a la mencionada xifra abans de la seva inclusió en l'estudi.

## E. ESTADISTICA INFERENCIAL

Les proves d'estadística inferencial s'han utilitzat **per rebutjar** o acceptar la hipòtesi nul·la (no s'observa diferència significativa) i la hipòtesi alternativa (diferència significativa). El nivell de significació exigít ha sigut del 0,05 bilateral.

Les proves utilitzades es van escollir en funció de les característiques de les variables, de la satisfacció de les condicions d'aplicació i del nombre de grups a comparar.

### a. Variables contínues

#### Anàlisi de la variància i Prova de la t de Student

Es van realitzar per comparar variables quantitatives que seguien una distribució normal independent i tenien unes variàncies similars (aplicant la F de Snedecor). La t de Student es va utilitzar per comparar dues poblacions i l'anàlisi de la variància (ANOVA) per comparar més de dues poblacions, realitzant després t de Student per definir les diferències amb la correcció de Bonferroni per acceptar la significació. Quan les proves d'aplicació ho exigien, es va aplicar la t per dades aparellades.

#### Prova de la U de Mann-Whitney i Prova de Kruskal-Wallis

Es van aplicar en aquells casos que les poblacions no satisfien les condicions d'aplicació de les proves paramètriques descrites abans. La U de Mann-Whitney es va aplicar en l'estudi de dues poblacions i la de Kruskal-Wallis per comparar més de dues poblacions seguida de repetides U de Mann-Whitney amb correcció de Bonferroni.

### b. Variables categòriques o variables contínues **categoritzades**

Les variables contínues es van categoritzar amb la finalitat d'evitar passar per alt relacions no proporcionals realitzant punts de tall a

diversos nivells. Les zones de tall es van escollir per mantenir un significat biològic, per ser valors numèrics senzills o per proporcionar una bona distribució de la població en estudi (ex: el valor mig o medià).

#### Prova de la Chi quadrat i correcció de Yates

S'utilitza per l'anàlisi de taules de contingència comparant el valor observat amb el valor teòric esperat, si la distribució fos homogènia. Quan la mostra incloïa menys de 50 individus, s'aplicava la correcció de Yates. Si la població estudiada era menor a 25 casos, s'utilitza una taula de contingència 2 x 2 emprant el Test exacte de Fisher.

#### **c. Estudis de corbes actuàries**

##### Anàlisi univariada

Per les corbes de supervivència actuarial s'ha emprat el mètode de Kaplan i Meier amb comparació entre les corbes pel mètode del log-rank.

Quan la variable independent era contínua, es van fer repetits talls de la mateixa per tal de trobar el punt de màxima significació estadística.

Les variables que van mostrar la seva significació a l'anàlisi univariada es van incloure en l'anàlisi multivariada.

##### Anàlisi multivariada

S'ha utilitzat el mètode de Cox del risc proporcional amb covariables o mètode de Cox. En el model es van incloure totes les variables significatives, o properes a la significació ( $p \leq 0,1$ ), obtingudes en l'estudi univariat i aquelles amb significació clínica o biològica referida a la literatura. Es va evitar incloure variables amb poca representació dintre de la sèrie. L'estudi es va repetir fins obtenir un model estable.

#### **d. Estudis de correlació**

La seva aplicació està orientada a determinar si una variable es

modifica en funció del valor d'una segona variable. S'ha utilitzat el mètode de regressió lineal amb ajustament pel mètode dels mínims quadrats. Per aquest mètode s'obté una recta teòrica de fórmula  $y=a+bx$ , un coeficient de regressió empíric ( $r$ ) i, derivat d'ell, un valor de significació ( $p$ ). El valor de  $p$  és influït pel nombre de casos, i la relació entre les variables serà més important com més s'aproximi a 1 el valor de  $r$ .

#### F. HARDWARE I SOFTWARE

L'emmagatzematge de les dades s'ha realitzat mitjançant un ordinador Epson PC J1. S'ha fet servir una base de dades amb el programa informàtic DBase III Plus. Les dades s'han transferit a programes per càlculs estadístics d'ordinador personal (Microstat o Primer of Biostatistics) mitjançant la creació d'arxius ASCII. Així mateix es va fer la transferència per via modem utilitzant un ordinador IBM PS/2-30 a un ordinador IBM XE-01 pertanyent al centre de càlcul de la Universitat de Barcelona. Amb l'ordinador del centre de càlcul s'han aplicat els programes del *software* estadístic BMDP (especialment els denominats P1D, P2D, P6D, P4F, P1L, P2L, P3D, P7D i PAR) (389). Pel càlcul de l'ajustament a les corbes de tipus *von Krogh* [ $f(x)=k/(1+(ax)^n$ ], els paràmetres de  $k$ ,  $n$  i  $a$  s'han obtingut per ajustament no lineal (BMDP, PAR) a l'ordinador connectat al centre de càlcul i la seva representació gràfica, així com la interpolació dels valors teòrics s'ha efectuat en un ordinador HP S45 fent servir un programa escrit específicament per aquest objectiu.

Taula 5.D.1

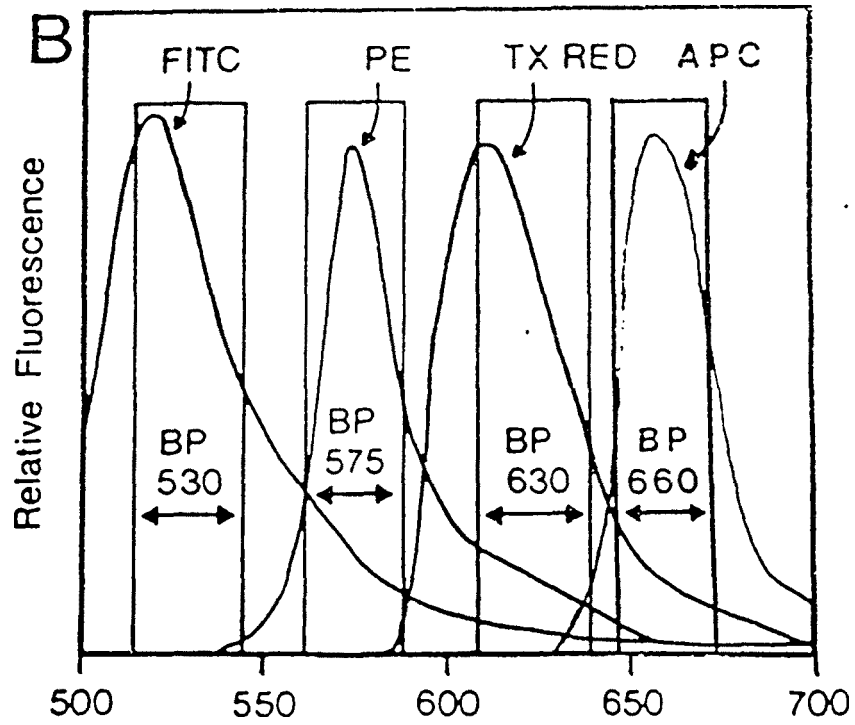
Característiques dels AcMo emprats en aquest estudi.

Nom	CD	Especificitat	Distribució	Fluorocrom
Leu 5b	CD2	LFA-3 (gp50)	Limfòcits T	FITC
Leu 12	CD19	gp95	Limfòcits B	FITC
Leu 3	CD4	gp59 (r-HIV)	Subpoblació T	FITC
Leu 2a	CD8	gp32a	Subpoblació T	FITC
Leu 11c	CD16	FcRIII	NK, grànuls, Mc	PE
Leu 15	CD11b	C3bi-R	NK, grànuls, M.	PE
Leu 7	CD57	gp110	NK, T	FITC
Leu 19	CD56	N-CAM	NK, limf. act.	PE

FITC = Fluoresceïna, PE = ficoeritrina, M. = monòcits, Mc = macròfags

Figura 5.D.1

Distribució de l'espectre d'emissió de la fluoresceïna i la ficoeritrina. Existeix una zona de solapament malgrat els filtres òptics.



BP= filtre *band pass*

PE= Ficoeritrina

APC= Alofococlanina

FITC= Fluoresceïna

TX RED = Vermell Texas

Figura 5.D.2a

Representació d'histogrames de fluorescència:

1. fluorescència emesa pel control negatiu i la col·locació del límit de negativitat
2. distribució d'una població que conté cèl·lules positives i negatives, considerades a partir de la marca prèvia

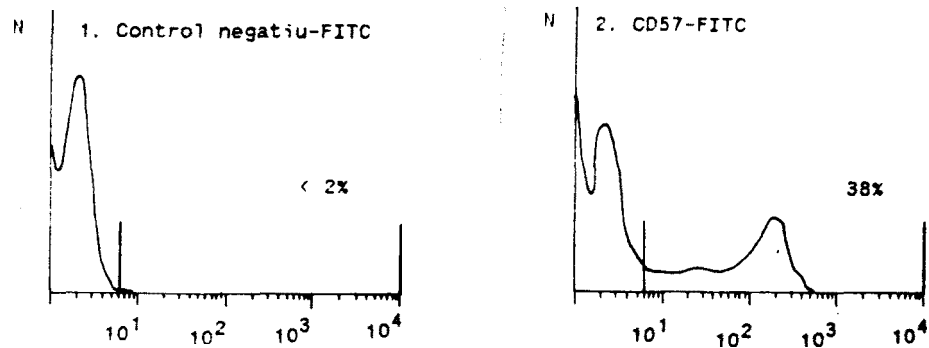
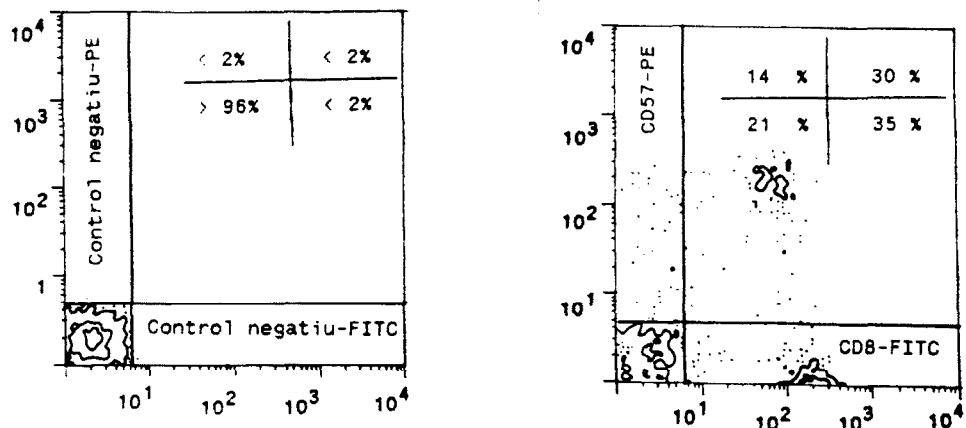


Figura 5.D.2b

Representació biparamètrica de dues fluorescències:

1. fluorescència emesa pel control negatiu i col·locació de les marques de negativitat
2. distribució de fluorescències d'una població que conté cèl·lules negatives, cèl·lules positives per cadascuna de les fluorescències i cèl·lules positives per ambdues fluorescències.



FITC= Fluoresceïna

PE= Ficoeritrina

## ESTANDARITZACIO DE LA TECNICA

### A. Alliberament espontani de l'isòtop radioactiu

A cada assaig de citotoxicitat realitzat al llarg d'aquest estudi s'ha valorat l'alliberament espontani de l'isòtop radioactiu obtingut a l'incubar les cèl·lules diana únicament en medi de cultiu. La mitjà i desviació estàndard dels valors d'alliberament espontani de cromat sòdic obtinguts en els assaigs de 4 hores d'incubació és de 12,68 %, amb una desviació estàndard de 3,06 %. En els estudis de citotoxicitat a 20 hores d'incubació els valors augmenten fins una mitjà de 26,64 %, amb una desviació estàndard de 6,18 % (taula 6.A.1).

### B. Anàlisi de la reproductibilitat experimental

#### 1. Anàlisi de la variabilitat intrassaig:

Les dades corresponents a la reproductibilitat dels valors experimentals de citotoxicitat es reflecteixen a la taula 6.A.2. El coeficient de variació observat és del 11,05 %. Aquesta variabilitat intrassaig s'ha considerat satisfactòria.

#### 2. Anàlisi de la variabilitat interassaig

A l'efectuar-se el càlcul de la reproductibilitat de les dades experimentals de la tècnica de citotoxicitat natural interassaig, el valor del coeficient de variació obtingut és del 11,24 % (taula 6.A.2). Aquest valor també es considera adequat.

### C. Bondat de l'ajustament de les dades experimentals a la corba de von Krogh teòrica

Els valors experimentals de citotoxicitat de pacients i controls s'han ajustat a una família de corbes teòriques de tipus von Krogh



$[f(x)=k/(1+(ax)^{-n})]$  (206) mitjançant el programa informàtic BMDP (AR).

### 1. Residuals de l'ajustament.

Els residuals resultants després de l'ajustament pel mètode de regressió no lineal mostren un valor mig de 7,67; amb una desviació estàndard de 14,6. La mediana dels residuals és de 12,6 amb uns extrems de 0 i 77,9.

### 2. Ajustament gràfic dels valors teòrics

A la figura 6.A.1a es representa de forma gràfica l'ajustament dels valors de citotoxicitat experimental a la corba teòrica d'un pacient amb LLC-B i a la 6.A.1b l'ajustament obtingut en un control.

### 3. Bondat de l'ajustament a la corba teòrica

El càlcul de la bondat de l'ajustament entre els valors experimentals i els teòrics derivats de la corba de von Krogh inferida no van mostrar diferències estadísticament significatives entre sí quan es va efectuar la comparació mitjançant la prova de  $\chi^2$  considerant els resultats teòrics com els esperats i els valors experimentals com observats (p sempre superior a 0,9 en pacients i controls). D'altra banda, el càlcul de regressió lineal entre els valors experimentals i teòrics per cadascuna de les proporcions D:E va mostrar sempre uns coeficients de correlació ( $r$ ) sempre superiors a 0,97 (taula 6.A.3 i 6.A.4).

#### D. Anàlisi de la reproductibilitat dels valors obtinguts després de l'ajustament teòric

##### 1. Anàlisi de la variabilitat intrassaig

L'ajustament a una corba de tipus von Krogh permet calcular uns valors teòrics de citotoxicitat per cadascuna de les proporcions D:E utilitzades. El coeficient de variació dels valors d'ANK intrassaig en el model teòric és de 11,34 %. Aquesta variabilitat intrassaig es considera correcta (taula 6.A.2).

##### 2. Anàlisi de la variabilitat interassaig

L'estudi de la variació dels valors teòrics d'ANK en assaigs diferents dona un coeficient de variació de 11,26 % (taula 6.A.2).

#### E. Oscil·lacions de l'ANK al llarg del temps en individus control

L'oscil·lació de l'ANK en controls es reflecteix en les figures 6.A.2a, on s'observen superposades les corbes de citotoxicitat obtingudes en un període de 18 mesos; i 6.A.2b que mostra les variacions en el transcurs dels mesos observades en l'ANK en una proporció D:E fixa. L'oscil·lació observada en l'ANK dels controls en els assaigs realitzats en el transcurs del temps va ser de 31,6%.

#### F. Valors de normalitat

Els valors de normalitat per la tècnica de citotoxicitat s'han obtingut després de testar 54 controls (29 homes i 24 dones). Les proporcions D:E utilitzades van oscil·lar entre 1:25 i 1:200. El valor mig de citotoxicitat teòrica a la proporció D:E 1:200 és de **40,2 %** (D.S. 17,4). (taula 6.A.4).

Taula 6.A.1

ALLIBERAMENT ESPONTANI D'ISOTOP RADIOACTIU  
(n= 53)

---

---

Mitjà:	12,68 %
D.S.:	3,06 %
Mediana:	12,40 %
Extrems:	8,39 % - 24 %

---

---

ALLIBERAMENT ESPONTANI D'ISOTOP RADIOACTIU (20 hores)  
(n= 7)

---

---

Mitjà:	26,64 %
D.S.:	6,18 %
Mediana:	27,50 %
Extrems:	19,29 % - 35,60 %

---

---

Taula 6.A.2

REPRODUCTIBILITAT DE L'ESTUDI D'ANK

---

---

	VALORS DE CITOTOXICITAT	
	EXPERIMENTALS	TEORICS
CV intrassaig	11,05 %	11,34 %
CV interassaig	11,24 %	11,26 %

---

---

CV = coeficient de variació

Figura 6.A.1a

Representació gràfica de l'ajustament de la corba teòrica als valors de citotoxicitat experimental en un pacient amb LLC-B.

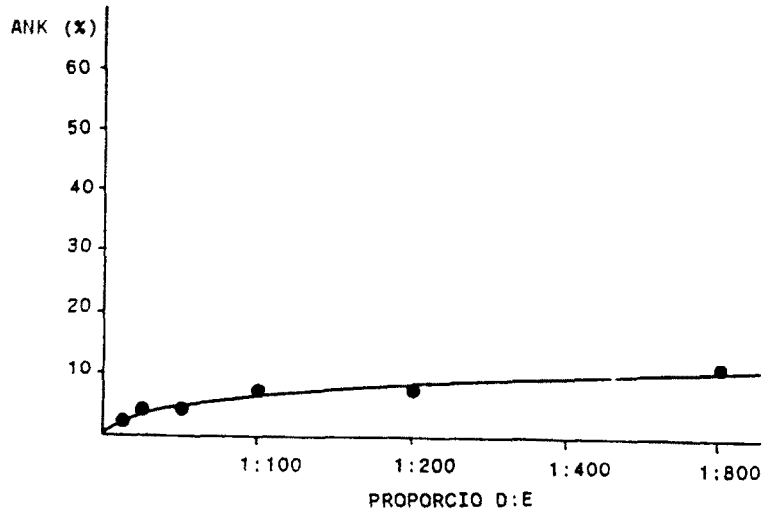
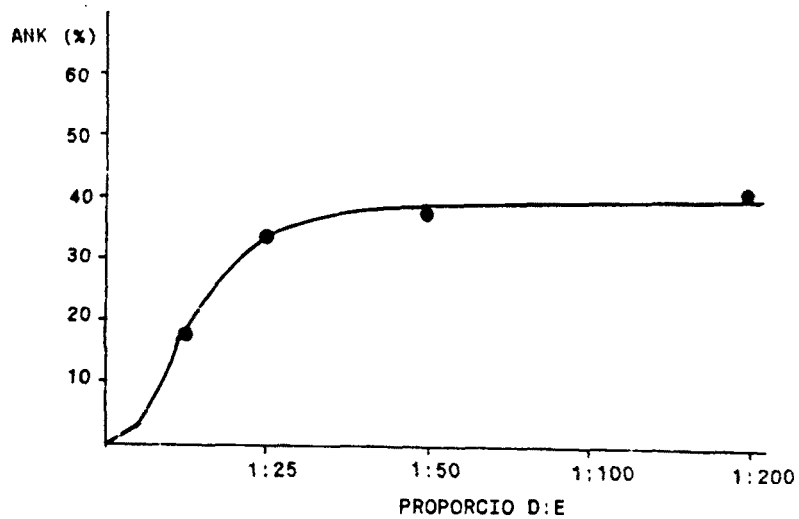


Figura 6.A.1b

Representació gràfica de l'ajustament de la corba teòrica als valors de citotoxicitat experimentals en un individu control



Taula 6.A.3

BONDAT DE L'AJUSTAMENT DELS VALORS EXPERIMENTALS A CORBES DE TIPUS VON KROGH. CORRELACIO ENTRE ELS VALORS EXPERIMENTALS I TEORICS EN CADASCUNA DE LES PROPORCIONS DIANA:EFECTORA ESTUDIADA EN ELS PACIENTS

## PACIENTS

	n	r	p
1:800	40	0,998	<0,001
1:400	54	0,994	<0,001
1:200	63	0,991	<0,001
1:100	66	0,999	<0,001
1:50	53	0,991	<0,001

Taula 6.A.4

## CONTROLS

	n	r	p
1:200	49	0,988	<0,001
1:100	53	0,972	<0,001
1:50	54	0,982	<0,001
1:25	54	0,976	<0,001

Figura 6.A.2a

Superposició dels punts de citotoxicitat experimental i de les corbes de citotoxicitat teòriques en un individu control obtingudes en un període de 18 mesos

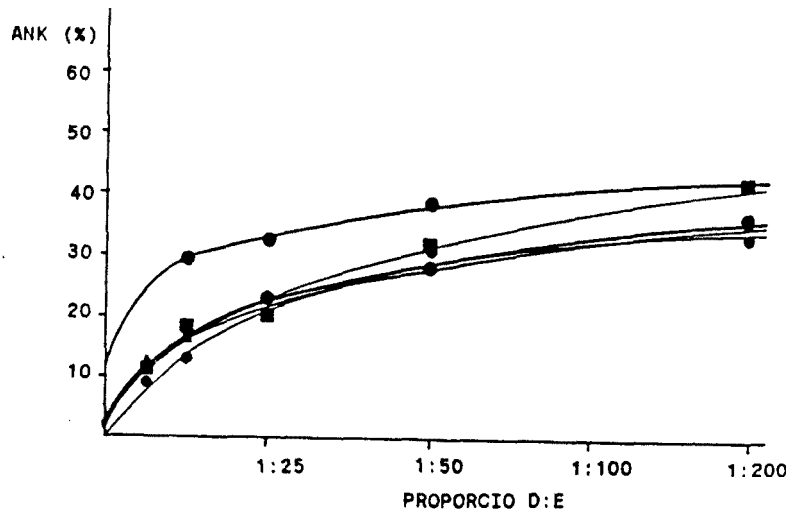
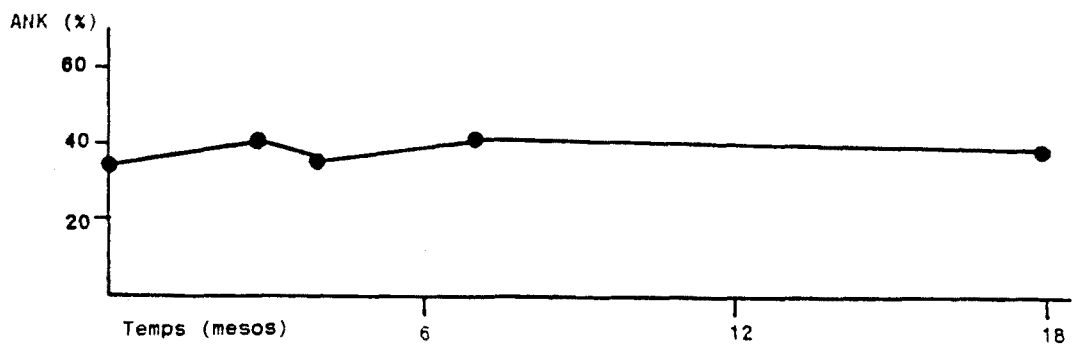


Figura 6.A.2b

Representació de les variacions en la citotoxicitat d'un individu control a una proporció D:E 1:200 en el transcurs de 18 mesos



Taula 6.A.4

## VALORS DE CITOTOXICITAT EXPERIMENTALS OBTINGUTS EN ELS CONTROLS

D:E	mitja $\pm$ D.S.	mediana	extrems
1:200	38,5 $\pm$ 15,6	34,9	13,7 - 73,7
1:100	31,7 $\pm$ 15,5	29,8	6,7 - 72,4
1:50	23,5 $\pm$ 14,0	20,3	1,8 - 59,6
1:25	16,4 $\pm$ 11,5	13,6	1,4 - 58,2

## VALORS DE CITOTOXICITAT TEORICA OBTINGUTS EN ELS CONTROLS (N=54)

D:E	mitja $\pm$ D.S.	mediana	extrems
1:200	40,2 $\pm$ 17,4	35,5	13,6 - 80,3
1:100	32,6 $\pm$ 15,5	31,7	7,0 - 68,5
1:50	24,3 $\pm$ 13,6	21,6	0,5 - 60,6
1:25	16,3 $\pm$ 11,4	12,8	0,03 - 52,9



## RESULTATS DELS ESTUDIS DE L'EFECTE DILUTOR DELS LIMFOCITS B A L'ACTIVITAT NATURAL KILLER DE CONTROLS

En cinc controls es va realitzar l'ANK a partir de la CMN obtinguda de sang heparinitzada i a partir de barrejes fetes entre aquesta CMN i limfòcits B normals purificats. De cada control es van realitzar barrejes cel·lulars que contenien un 20%, 33%, 50 %, 66% i 80 % de limfòcits B. Cadascuna d'aquestes barrejes es va tractar com una mostra independent, es a dir, es van ajustar diverses proporcions D:E i es van testar per triplicat.

En les mostres on existia barreja de limfòcits B l'ANK era inferior a la desenvolupada per la mostra pura en cadascuna de les proporcions D:E. El descens produït en l'ANK augmentava a mesura que la concentració de limfòcits B era més gran, com s'observa en la següent taula:

Proporció D:E	Puresa					
	100 %	80 %	66 %	50 %	33 %	20%
1:200	64,45	57,03	53,30	52,68	46,45	33,05

L'efecte que l'addició de limfòcits B provoca sobre l'ANK es una reducció linial de citotoxicitat (figura 6.B.1). La r mediana d'ajustament lineal obtingut ha sigut de 0,98 amb uns valors extrems entre 0,81 i 0,999.

Per cada una de les mostres, pura o mescla, es va realitzar l'ajustament teòric a una corba de von Krogh, i es van inferir els resultats teòrics de cadascuna de les proporcions D:E. En les mostres en què existia mescla de limfòcits B es van calcular dues corbes:

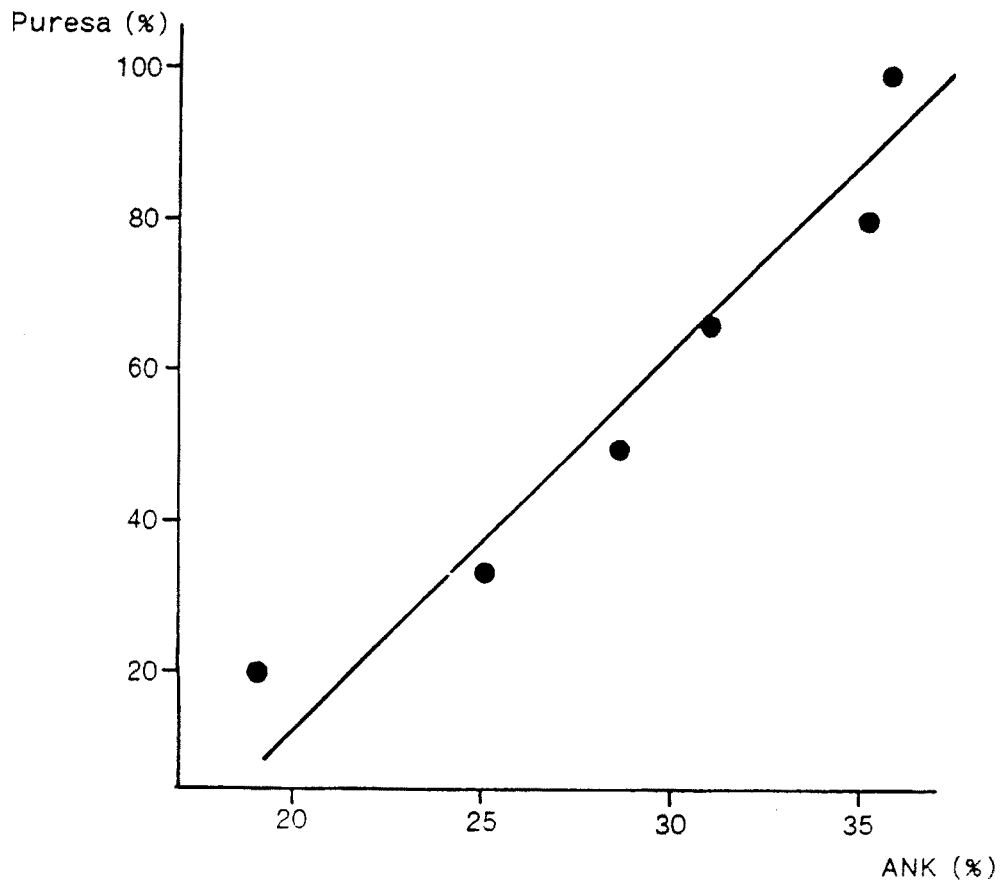
- 1) considerant la mostra com a tal i,
- 2) considerant la puresa real de la mostra

[ex. per una barreja amb un 20 % de limfòcits B es va considerar per la primera corba una proporció 1:200 i per la segona corba una proporció real de 1:160, obtinguda de multiplicar el 200 inicial per la resta entre la puresa teòrica i el % de limfòcits B -  $200(100-20)$ ]. La comparació entre parelles de valors teòrics d'ANK obtinguts de la CMN pura i de la barreja, un cop feta la proporció real de limfòcits, mostra una relació lineal entre els diversos valors ( $n=30$ ,  $r=0,938$ ). La mateixa comparació s'ha realitzat pels valors de citotoxicitat experimental obtenint-se un resultat similar ( $n=15$ ,  $r=0,978$ ).

Per tant, la disminució d'ANK que provoquen els limfòcits B és secundari a un efecte dilucional. Aquest efecte dilucional es pot observar molt bé en la representació gràfica de les corbes de citotoxicitat teòrica (figura 6.B.2a i 6.B.2b). Les corbes obtingudes quan no es té en compte la proporció de limfòcits B afegits a la suspensió cel·lular estan clarament separades, mentre que al corregir l'efecte dilucional de la població limfoide B les corbes se superposen.

Figura 6.B.1

Efecte de l'increment de limfòcits B en l'ANK d'individus controls  
(proporció D:E 1:200)



La recta assenyala la funció de correlació ( $y = 17,12781 + 0,205883 x$ )  
 $r = 09646$

Figura 6.B.2a

Corbes de citotoxicitat teòrica i punts de citotoxicitat experimental obtinguts de CMN pura i barrejada amb diverses proporcions de limfòcits B normals

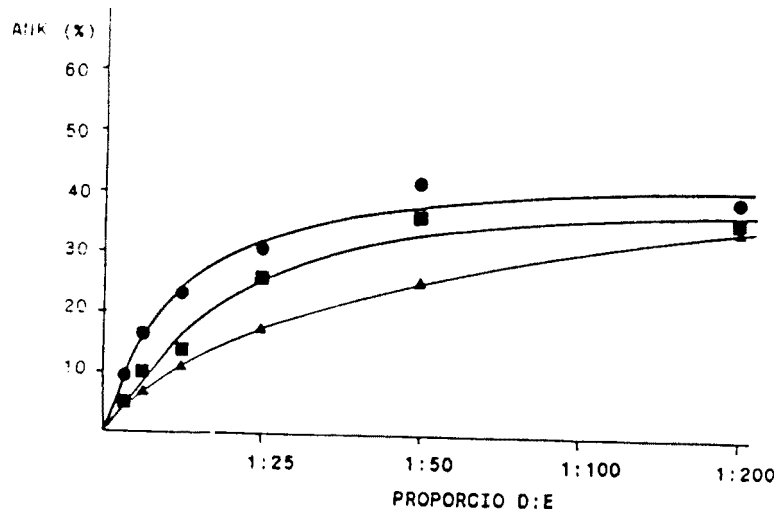
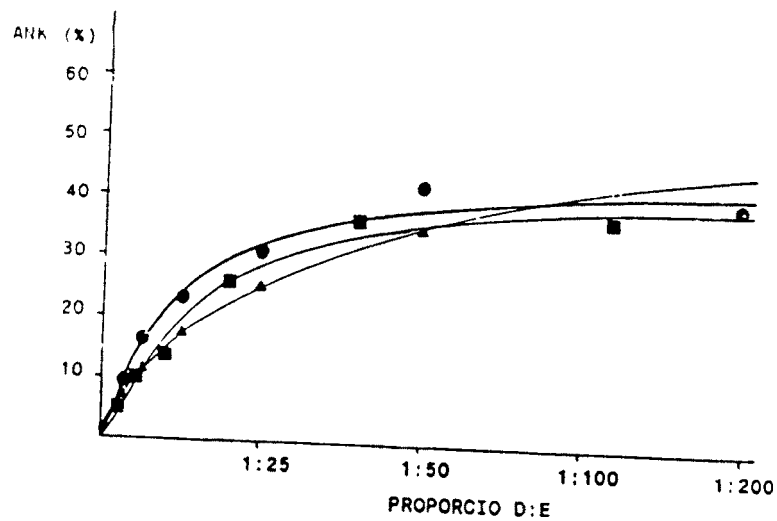


Figura 6.B.2b

Corbes de citotoxicitat teòrica i punts de citotoxicitat experimental del mateix individu després de realitzar la correcció segons la puresa real de la CMN



## ESTADISTICA DESCRIPTIVA

### 1. Pacients

S'han inclòs 67 pacients afectes de LLC-B amb una edat mediana de 68 anys (30 anys - 92 anys). Trenta-sis eren homes (53,78%) i trenta-un eren dones (46,27%). Les característiques clíniques inicials i les del moment de l'estudi estan recollides en la taula 6.C.1, 6.C.2. La majoria de pacients no presentava adenomegàlies (59,7%) o visceromegàlies en el moment del diagnòstic (77,6%) o en moment de l'estudi de citotoxicitat (59,7% i 80,6% respectivament).

Les dades analítiques del moment del diagnòstic i del moment de l'estudi estan exposades a les taules 6.C.3 i 6.C.4. La xifra mitja de limfòcits a SP en el moment del diagnòstic era de  $32,2 \times 10^9/L$  ( $\pm 48,4$ ), la d'hemoglobina de 140,9 g/L ( $\pm 19,6$ ), i la de plaquetes de  $195,4 \times 10^9/L$  ( $\pm 68,8$ ). Catorze malalts (20,9%) tenien, en el moment del diagnòstic, una xifra de limfòcits superior a  $30 \times 10^9/L$ . Existia anèmia (hemoglobina  $< 120$  g/L) en 6 pacients (8,9%) i plaquetopènia en 3 (4,5%). La infiltració limfocitària en el mielograma era superior al 30% de la cel.lularitat en la majoria de pacients (93%). El patró histològic predominant a la biòpsia de moll d'os va ser el mixte, amb un gran predomini dels patrons no-difusos (89%). Els valors d'immunoglobulines inicials (mitja  $\pm$  D.S.) eren per la Ig G de 1063 mg/100mL ( $\pm 414$ ), per la Ig M de 102 mg/100mL ( $\pm 94$ ) i per la Ig A de 172 mg/100mL ( $\pm 103$ ). A l'inici de la malaltia sis pacients (10,2%) tenien disminució dels nivells d'Ig G ( $< 650$  mg/100mL), disset malalts (28,8%) tenien uns nivells d'Ig M inferiors a 45 mg/100 mL i sis pacients (10,1%) presentaven uns valors d'Ig A inferiors a 60 mg/100 mL. El 85,7% dels pacients (n=42) en els que es disposa de l'estudi de distribució de cadena lleugera expressen *kappa* i el 14,3% *lambda*.

El temps de duplicació limfocitari s'ha pogut calcular en 50 pacients ja que en els disset restants es va iniciar tractament abans dels tres mesos del diagnòstic o quan no es disposava dels tres hemogrames mínims

pel càlcul. En la majoria de malalts el TDL és superior als 12 mesos (68%).

La distribució dels pacients segons els estadis clínics de Rai i Binet, i el nombre de pacients que aconsegueixen els criteris de LLC quiescent, s'observa a les figures 6.C.1 a 6.C.8. En el moment del diagnòstic predominen els pacients en estadis poc avançats (estadis A o estadis 0). Així, trenta-tres malalts (49,3%) estan en estadi 0 de Rai i quaranta-nou (73,1%) en estadi A de Binet. Es va observar hepatomegàlia no atribuïda a la malaltia en tres pacients (num 6 i 11 per enolisme, i num 37 per hepatitis crònica per virus B). En els pacients número 16, 21, 24, 25, 35, 41 i 54 no es disposava de les dades necessàries per poder classificar-los dintre del grup de LLC-B quiescent o no-quiescent. De la sèrie global, dinou malalts (28,3%) aconsegueixen criteris de LLC quiescent. Dintre del grup de pacients en estadi A de Binet el 38,8% reuneixen els criteris de LLC quiescent.

La mediana de mesos entre el diagnòstic i la inclusió en l'estudi és de 32,36 mesos amb uns extrems de 0,1 a 139,7 mesos. Quaranta-sis malalts no rebien tractament en el moment de l'estudi, tretze rebien tractament amb CLB o CLB+PDN, un pacient rebia només PDN i quatre seguien esquemes poliquimioteràpics (dos pacients CHOP i dos CMP).

Els valors de citotoxicitat, experimentals i teòrics, obtinguts en els 67 pacients estan recollits, per cadascuna de les proporcions D:E, en les taules 6.C.5. La citotoxicitat teòrica mitja ( $\pm$ D.S.) per la proporció 1:200 és de 19,4 % ( $\pm$ 16,2). El valor mínim d'activitat lítica teòrica és de 0 % d'ANK amb un màxim de 63,5%.

Els resultats de l'estudi de les poblacions limfocitàries es descriu a les taules 6.C.6. La xifra mitja ( $\pm$ D.S.) de limfòcits CD2<sup>+</sup> va ser de  $4,1 \times 10^9/L$  ( $\pm$ 3,6), que expressat en forma de percentatge va representar entre el 3% i el 82% de limfòcits de SP. Dintre de les subpoblacions T, la xifra mitja de limfòcits CD4<sup>+</sup> va ser de  $1,9 \times 10^9/L$  ( $\pm$ 1,5) i de  $1,2 \times 10^9/L$  ( $\pm$ 1,7) pels limfòcits CD8<sup>+</sup>. Les poblacions limfocitàries amb antígens NK va mostrar una mitja de  $0,8 \times 10^9/L$  ( $\pm$ 1,2) pel CD16,  $1,2 \times 10^9/L$  ( $\pm$ 1,7) pel CD57,

$1,8 \times 10^9/L$  ( $\pm 2,4$ ) pel CD11b i  $0,6 \times 10^9/L$  ( $\pm 0,8$ ) pel CD56. Els limfòcits B, mesurats pel l'expressió de CD19, estaven augmentats ( $31,8 \times 10^9/L \pm 44,8$ ) amb un mínim de  $0,04 \times 10^9/L$  i un màxim de  $188,2 \times 10^9/L$ .

La relació entre les diverses poblacions limfocitàries, expressades en forma de quocient es recullen a la taula 6.C.7. Per exemple, el quocient CD4/CD8 té un valor mig de 2,3 ( $\pm 1,3$ ) i el quocient CD2/CD19 un valor de 1,5 ( $\pm 4,1$ ). La taula 6.C.8 recull els valors percentuals i absoluts de limfòcits CD16<sup>+</sup> que coexpressen CD4, CD8 i CD57 així com el percentatge de limfòcits CD11b<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup> que coexpressen CD2.

En el moment de finalitzar l'estudi quatre pacients (6%) havien mort. En tres casos la mort va ser deguda a processos infecciosos i en un cas a transformació de la LLC-B en un limfoma no Hodgkin d'alt grau de malignitat. La mediana de seguiment des de la realització de l'ANK és de 12,2 mesos (extrems 0,01-19,5). La mediana de supervivència no s'ha assolit tant si es considera la data de la inclusió a l'estudi com la data del diagnòstic.

La progressió de la limfocitosi fins superar la xifra de  $50 \times 10^9/L$  s'ha observat en 4 (7,5%) dels 53 malalts en risc de desenvolupar-la. El temps d'evolució des de la inclusió a l'estudi fins superar els  $50 \times 10^9/L$  limfòcits ha sigut de 5,2 a 12,8 mesos.

La progressió a un estadi clínic superior s'ha valorat en els pacients no tractats. Dels trenta-sis malalts quatre (11,1%) han progressat. Els canvis d'estadi han sigut de A(0) a A(I) en dos pacients, de A(0) a A(II) en un pacient i de A(0) a C(IV) en un pacient. El temps de progressió ha sigut entre 0,8 mesos i 16,3 mesos.

Taula 6.C.1

Principals dades característiques inicials i en el moment de l'estudi

		Mitja (DS)		Mediana (extrems)	
Edat (anys)		67,81 (12,10)		68 (30 - 92)	
Període (mesos) diagnòstic-ANK		19,12 (36,31)		32,36 (0,1 - 139,7)	
CARACTERÍSTICA		INICIAL		ACTUAL	
		n	%	n	%
Sexe	Masculí	36	(53,7%)	--	---
	Femení	31	(46,3%)	--	---
Adenopaties	Si	27	(40,3 %)	27	(40,3%)
	No	40	(59,7 %)	40	(59,7%)
Hepatomegàlia	Si	7	(10,4 %)	7	(10,4%)
	No	60	(89,5 %)	60	(89,5%)
Esplenomegàlia	Si	14	(20,9 %)	13	(19,4%)
	No	53	(79,1 %)	54	(80,6%)
Territoris Binet	Cap	35	(52,2 %)	35	(52,2%)
	1	15	(22,4 %)	16	(23,9%)
	2	2	( 3,0 %)	2	( 3,0%)
	3	8	(11,9 %)	11	(16,4%)
	4	4	( 6,0 %)	3	( 4,5%)
	5	3	( 4,5 %)	0	---



Taula 6.C.2

Distribució segons la infiltració limfocitària medul·lar, el patró de BMO i el TDL

---



---

**Infiltració limfocitària al mielograma**

≤ 30 %	5	( 7,46 %)
31 - 60 %	25	(37,31 %)
61 - 100 %	27	(40,30 %)
No practicat	10	(14,93 %)

**Patró d'infiltració a biòpsia de moll d'os**

Intersticial	2	( 2,99 %)
Nodular	22	(32,84 %)
Mixte	24	(35,82 %)
Difús	6	( 8,95 %)
No practicada	13	(19,40 %)

**Temps de duplicació limfocitària**

< 12 mesos	16	(23,88 %)
> 12 mesos	34	(50,75 %)
No calculable	17	(25,37 %)

---

Taula 6.C.3

Descripció dels principals paràmetres hematològics en el moment de l'estudi de citotoxicitat

Paràmetre*	Mitja± D.S.	Mediana	Extrems	n
Leucòcits	45,8 ± 50,8	27,0	3,5-294,0	67
Limfòcits	36,1 ± 43,9	20,1	1,2-235,0	67
LGG°	0,8 ± 0,8	0,7	0 - 5,0	59
Neutròfils	6,3 ± 5,4	5,2	1,5- 35,3	67
Monòcits	1,0 ± 1,5	0,7	0 - 11,8	67
Centròcits	2,0 ± 7,6	0	0 - 60,0	67
Centroblasts	0,5 ± 1,2	0	0 - 7,2	67
Prolimfòcits	0,03± 0,2	0	0 - 1,8	67

\* Els valors de leucòcits estan expressats en  $\times 10^9/L$

° LGG = limfòcit gran granulat

Taula 6.C.4

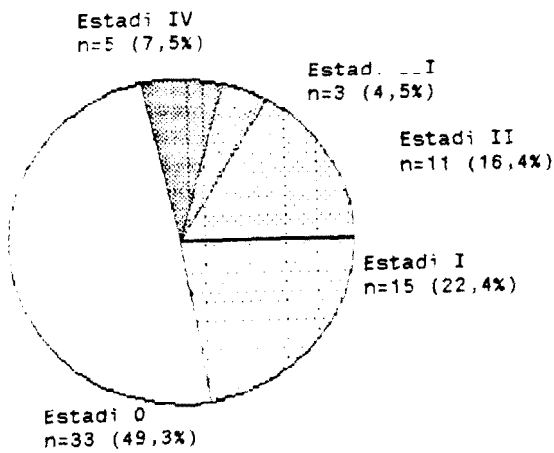
Descripció dels principals paràmetres bioquímics i immunològics inicials i en el moment de l'estudi

Paràmetre	Mitja $\pm$ D.S	Mediana	Extrems	n
<b>INICIAL</b>				
Proteïnes totals (g/L)	71,2 $\pm$ 6,8	72	51 - 90	67
Albúmina (g/L)	43,2 $\pm$ 6,2	43,4	24 - 59	66
Gammaglobulina (g/L)	10,0 $\pm$ 3,8	9,7	3,7- 26,7	66
Ig G (mg % mL)	1063,9 $\pm$ 414,8	963	250 - 3150	59
Ig A (mg % mL)	172,6 $\pm$ 103,5	153	42 - 472	59
Ig M (mg % mL)	102,7 $\pm$ 94,5	59	32 - 420	59
LDH (UI/L)	386,6 $\pm$ 266,9	342	206 - 2299	61
<b>ACTUAL</b>				
Ig G (mg % mL)	944,1 $\pm$ 332,0	963	250 - 1510	28
Ig A (mg % mL)	208,8 $\pm$ 158,5	186	42 - 700	28
Ig M (mg % mL)	83,5 $\pm$ 87,3	57,5	12 - 420	28

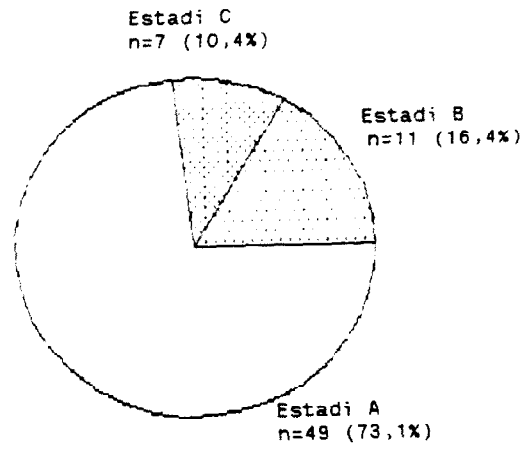
Figures 6.C.1, 6.C.2 i 6.C.3

DISTRIBUCIO DELS PACIENTS SEGONS ELS ESTADIS CLINICS

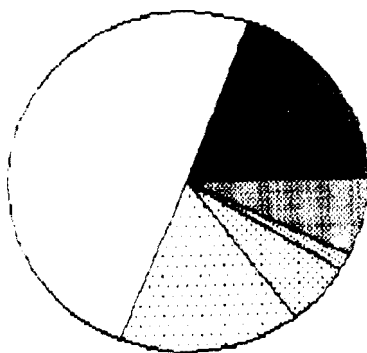
ESTADIS DE RAI



ESTADIS DE BINET



COMBINACIO DELS ESTADIS DE RAI I BINET



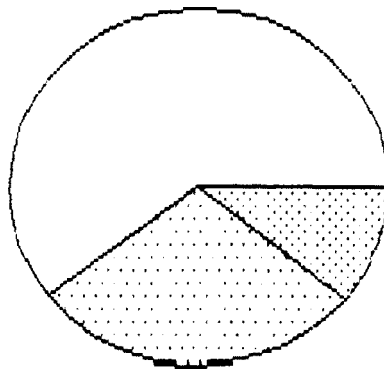
A(0)		n= 3 (4,9%)
A(I)		n=11 (16,4%)
A(II)		n=4 (6%)
A(III)		n=1 (1,5%)
B(I)		n=5 (7,5%)
B(II)		n=6 (9%)
C(III)		n=2 (3%)
C(IV)		n=5 (7,5%)

Figures 6.C.4 i 6.C.5

DISTRIBUCIO SEGONS ELS CRITERIS DE LLC QUIESCENT

SERIE GLOBAL

LLC NO QUIESCENT  
n=41 (61,2%)

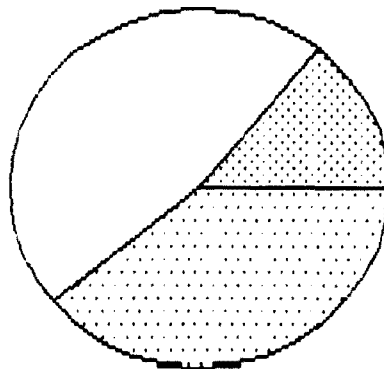


NO CLASSIFICABLE  
n=7 (10,4%)

LLC QUIESCENT  
n=19 (28,3%)

PACIENTS EN ESTADI A DE BINET

LLC NO QUIESCENT  
n=23 (46,9%)



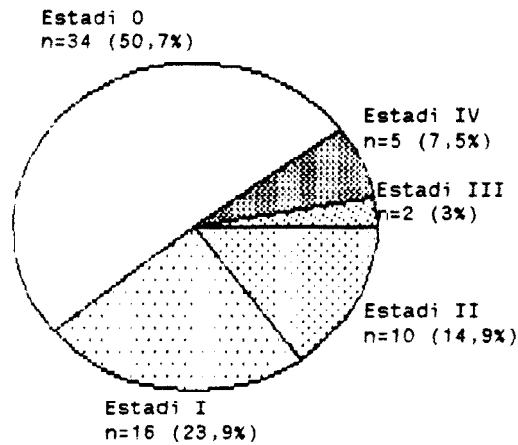
NO CLASSIFICABLE  
n=7 (14,3%)

LLC QUIESCENT  
n=19 (38,8%)

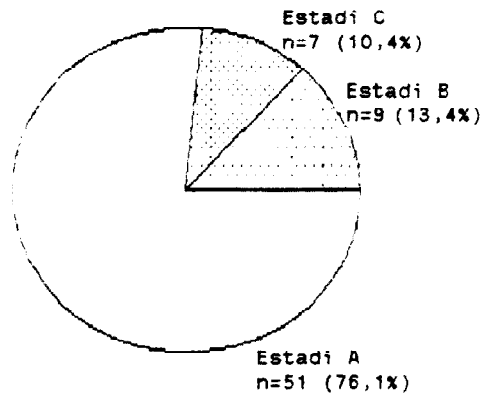
Figures 6.C.6, 6.C.7 i 6.C.8

ESTADIS CLINICS EN EL MOMENT DE L'ESTUDI

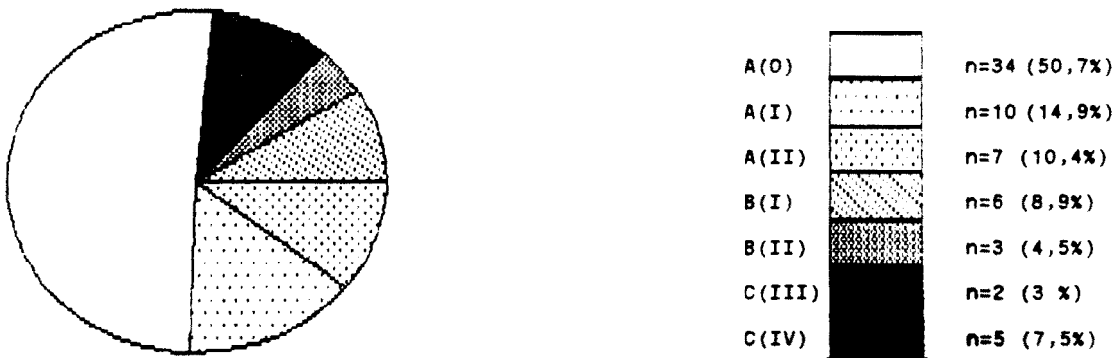
ESTADIS DE RAI



ESTADIS DE BINET



DISTRIBUCIO SEGONS ELS ESTADIS DE RAI I BINET EN EL MOMENT DE L'ESTUDI



Taula 6.C.5

Resultats de l'estudi de citotoxicitat

Proporció D:E	Mitja $\pm$ D.S.	Mediana	Extrems	n
ANK EXPERIMENTAL (%)				
1:800	29,1 $\pm$ 17,5	31,2	5,4 - 66,4	40
1:400	23,1 $\pm$ 17,6	20,1	2,8 - 62,2	54
1:200	18,3 $\pm$ 15,4	12,4	0 - 61,5	63
1:100	14,0 $\pm$ 13,7	7,9	0 - 57,3	66
1:50	8,6 $\pm$ 9,4	4,1	0 - 38,4	53
ANK TEORICA (%)				
1:800	29,5 $\pm$ 22,1	27,7	2,8 - 90,2	67
1:400	24,5 $\pm$ 19,0	21,1	3,0 - 73,8	67
1:200	19,4 $\pm$ 16,2	14,7	2,3 - 63,5	67
1:100	14,3 $\pm$ 13,8	7,8	0 - 57,4	67
1:50	10,1 $\pm$ 11,5	5,1	0 - 57,2	67
1:25	7,0 $\pm$ 9,3	3,1	0 - 53,6	67

Taula 6.C.6

Poblacions limfocitàries dels pacients en el moment de l'estudi

Població	Mitja $\pm$ D.S.	Mediana	Extrems	n
CD2	4,1 $\pm$ 3,6	2,9	0,60 - 18,8	44
CD4	1,9 $\pm$ 1,5	1,4	0,03 - 6,6	56
CD8	1,2 $\pm$ 1,7	0,8	0,04 - 11,8	56
CD16	0,7 $\pm$ 1,2	0,4	0,009 - 7,1	56
CD11b	1,8 $\pm$ 2,4	1,1	0 - 16,5	56
CD57	1,2 $\pm$ 1,7	0,7	0,009 - 11,8	56
CD56	0,6 $\pm$ 0,8	0,4	0 - 2,3	17
CD19	31,2 $\pm$ 44,4	17,3	0,04- 188,2	42

Les xifres de cadascuna de les poblacions estan expressades per  $10^9/L$



Taula 6.C.7

## DISTRIBUCIO DELS QUOCIENTS ENTRE LES DIVERSES POBLACIONS LIMFOCITARIES

Quocient	Mitja $\pm$ D.S.	Mediana	Extrems	n
CD4/CD8	2,3 $\pm$ 1,3	2,2	0,06 - 5,5	56
CD2/CD19	1,5 $\pm$ 4,1	0,2	0,02 - 23,3	42
CD16/CD2	0,2 $\pm$ 0,2	0,2	0,01 - 0,7	44
CD16/CD8	0,9 $\pm$ 1,1	0,5	0,02 - 7,6	56
CD16/CD57	0,9 $\pm$ 0,8	0,7	0,02 - 4,3	56
CD16/CD11b	0,5 $\pm$ 0,4	0,4	0,01 - 2,0	54
CD16/CD56	1,2 $\pm$ 1,9	0,6	0,07 - 8,0	15

Taula 6.C.8

## DISTRIBUCIO DE LES POBLACIONS LIMFOCITARIES DEFINIDES PER DOS DETERMINANTS ANTIGENICS

Població	Mitja $\pm$ D.S.	Mediana	Extrems	n
<b>VALORS PERCENTUALS</b>				
CD16 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	10,2 $\pm$ 9,5	8,3	0,01 - 38,0	34
CD16 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	25,7 $\pm$ 14,1	27,0	1,56 - 58,2	33
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	47,5 $\pm$ 20,5	48,6	2,00 - 92,4	33
CD11b <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	62,4 $\pm$ 14,1	63,9	27,5 - 84,0	17
CD56 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	59,1 $\pm$ 22,8	60,1	13,2 - 91,4	10
<b>VALORS ABSOLUTS</b>				
CD16 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0,08 $\pm$ 0,28	0,03	0,00 - 1,6	34
CD16 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,19 $\pm$ 0,23	0,10	0,00 - 1,1	33
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,54 $\pm$ 1,18	0,22	0,01 - 6,5	33
CD11b <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	1,10 $\pm$ 1,09	0,86	0,13 - 4,6	17
CD56 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	0,55 $\pm$ 0,68	0,27	0,03 - 2,1	10

## A. ACTIVITAT NATURAL KILLER

### 1. COMPARACIO AMB ELS VALORS CONTROL

L'activitat natural killer exercida pels pacients amb LLC-B és inferior a la dels valors control en cadascuna de les proporcions D:E analitzades. La citotoxicitat teòrica mitja dels 67 pacients a una proporció D:E 1:200 és de 19,4% ( $\pm 16,2$ ) enfront d'uns valors control per la mateixa proporció D:E de 40,2% ( $\pm 17,4$ ) ( $p < 0,001$ ). La relació entre la resta de proporcions D:E s'exposa a la taula 6.C.2.1.

Tretze malalts (19,4%) desenvolupen una ANK normal ( $> 30\%$ ). D'aquests, vuit són malalts no tractats prèviament. Predominen els estadis poc avançats (69,2% en estadi 0 de Rai) sense assolir significació estadística.

### 2. ACTIVITAT NATURAL KILLER I CARACTERISTIQUES DELS PACIENTS

#### 2.a. Característiques clíniques i Estadis clínics

No s'ha trobat relació entre l'ANK i cap característica clínica dels pacients (edat, sexe, presència d'adenopaties o esplenomegàlia), excepte la presència d'hepatomegàlia en el moment de l'estudi. Els pacients sense hepatomegàlia en el moment de l'estudi (60 malalts) desenvolupen una citotoxicitat superior que els pacients amb hepatomegàlia (7 malalts) (ex: proporció D:E 1:200 20,8%  $\pm 16,5$  vs 6,9%  $\pm 4,4$ ,  $p = 0,03$ ). Els malalts amb hepatomegàlia pertanyen a estadis avançats (quatre en estadi C) i presenten una xifra de limfòcits elevada ( $66,6 \times 10^9/L \pm 58,8$  vs  $32,5 \times 10^9/L \pm 41,0$ ;  $p = 0,05$ ).

L'ANK que desenvolupen els pacients no va mostrar relació amb l'estadi clínic inicial segons la classificació de Rai ni segons la classificació de l'*International Workshop on CLL*. La citotoxicitat per cadascuna de les diverses proporcions D:E va ser similar en tots els

estadis clínics.

L'estadi clínic de Rai en el moment de l'estudi **tampoc va mostrar relació amb l'ANK** (taula 6.C.2.2). No obstant, si s'agrupen els malalts en estadi precoç de Rai (0), estadi intermedi (I,II) i estadi avançat (III,IV) l'ANK, en les proporcions D:E més elevades, mostra diferències significatives entre el grup de pacients en estadi avançat respecte la resta de malalts (taula 6.C.2.3). L'estadi de Binet en el moment de realitzar l'estudi de citotoxicitat sí que delimita un grup de pacients amb menor citotoxicitat. Els malalts estadi C produeixen una citotoxicitat menor que els malalts en estadis més precoços ( $11,3\% \pm 9,9$  vs  $30,5\% \pm 21,5$  i  $37,8\% \pm 26$ , proporció D:E 1:200) (taula 6.C.2.4). La diferència en la citotoxicitat és només evident en les proporcions D:E més elevades.

#### 2.b. Característiques analítiques

L'ANK provocada pels malalts mostra relació amb la xifra de leucòcits i limfòcits. Aquesta relació s'observa amb els valors de l'hemograma inicial i amb les xifres leucocitàries en el moment de l'assaig de citotoxicitat. La relació entre la citotoxicitat i les xifres leucocitàries és una relació inversa i s'observa en cadascuna de les proporcions D:E utilitzades (taula 6.C.2.5). Es poden definir dos grups de malalts amb citotoxicitat diferent si s'efectuen divisions dels mateixos segons diversos punts de tall de la xifra de leucòcits o limfòcits ( $50 \times 10^9/L$ ,  $30 \times 10^9/L$ ,  $20 \times 10^9/L$  i  $15 \times 10^9/L$ ). La diferència significativa en la citotoxicitat desenvolupada s'objectiva en proporcions D:E diferents segons el nivell de tall escollit. Així, la màxima diferència de citotoxicitat s'obté en les proporcions D:E més elevades (proporció 1:800 a 1:200) quan el tall es realitza a  $50 \times 10^9/L$ , mentre que al comparar la citotoxicitat dels grups de pacients obtinguts al tallar a  $15 \times 10^9/L$  limfòcits la màxima diferència en l'ANK s'obté en les proporcions D:E més baixes (1:200 a 1:25) (taula 6.C.2.6).

No existeix una relació directa entre la citotoxicitat i el nombre de LGG observats, però el fet de tenir més de  $0,5 \times 10^9/L$  LGG defineix un

97,9x10<sup>9</sup>/L (±43,8) contra 25,8x10<sup>9</sup>/L (±25,5) dels 23 pacients restants (p<0,001).

Els pacients amb una ANK normal tenen una xifra de limfòcits total i CD19<sup>+</sup> inferiors a la resta de pacients sense assolir significació estadística (16,9x10<sup>9</sup>/L ±12,4 vs 40,7x10<sup>9</sup>/L ±47,5; 12,2x10<sup>9</sup>/L ±12,3 vs 38,1x10<sup>9</sup>/L ±49,6 respectivament). No s'han observat diferències en el nombre de LGG.

### 3. ACTIVITAT NATURAL KILLER I POBLACIONS LIMFOCITÀRIES

L'activitat natural killer no ha mostrat una relació directa amb les poblacions limfocitàries T i NK, tant si es consideren de forma percentual com absoluta. No obstant, el grup de pacients amb un percentatge de població limfocitària T i NK superior a la xifra mitja de la sèrie global és capaç de produir una citotoxicitat més elevada que el grup de pacients amb un percentatge de poblacions T i NK inferiors a la mitja (taula 6.C.2.8, 6.C.2.9). La diferència d'ANK segons el percentatge mitjà s'observa en totes les subpoblacions excepte per la població CD8<sup>+</sup>. Pels antígens CD11b, CD16 i CD57 també es poden delimitar dos grups de pacients de citotoxicitat diferent considerant el grup amb un percentatge normal d'aquests antígens *versus* la resta de malalts. Aquest fet no s'observa pels antígens CD2 i CD4. El grup de pacients amb uns percentatges superiors a la mitja de la sèrie desenvolupen una citotoxicitat que, a una proporció 1:200, no difereix de la dels controls per les poblacions CD2<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> i CD57<sup>+</sup>.

El comportament de la població limfocitària CD19<sup>+</sup> és la inversa de les poblacions T i NK. Les diferències en l'ANK s'observen quan existeixen diferències en valor absolut de la població CD19<sup>+</sup>.

No s'ha observat relació entre l'ANK i els **quocients** limfocitàris excepte pel quocient CD16/CD11b. Els malalts amb un quocient superior a 0,4 (n=25) desenvolupen una citotoxicitat superior a la resta (n=23) en les proporcions D:E 1:100 a 1:25 (ex: D:E 1:100, 17,24% ± 16,4 vs 9,3% ±10,0;

p=0,05). Els percentatges de limfòcits CD16<sup>+</sup> que coexpressen els antígens CD4, CD8 o CD57, així com el percentatge de limfòcits CD11b<sup>+</sup> o CD56<sup>+</sup> que coexpressen CD2, no han mostrat relació amb ANK. Els valors absoluts d'aquestes poblacions es comporten de forma similar.

Els pacients amb activitat lítica normal tenen el mateix nombre absolut en cap de les poblacions limfocitàries. En canvi, s'han observat diferències significatives en el percentatge de limfòcits CD2<sup>+</sup> (33,3% ±24,8 vs 18,1% ±17,4; p=0,003), CD4<sup>+</sup> (15,5% ±9,4 vs 8% ±9; p=0,02), CD16<sup>+</sup> (12,7% ±15,9 vs 2,5% ±3,8; p<0,001), CD57<sup>+</sup> (11,4% ±11,9 vs 4,3% ±4,9; p=0,002), CD11b<sup>+</sup> (18,1% ±17 vs 6,3% ±6,8; p<0,001) i CD56<sup>+</sup> (22,5% ±30,4 vs 1,6% ±1,4; p=0,002).

Taula 6.C.2.1

Comparació entre l'activitat natural killer teòrica dels pacients i dels controls

	PACIENTS (n=67)	CONTROLS (n=54)	p
ANK (%) 1:800	29,5 ± 22,1	---	
ANK (%) 1:400	24,5 ± 19,0	---	
ANK (%) 1:200	19,4 ± 16,2	40,2 ± 17,4	<0,001
ANK (%) 1:100	14,3 ± 13,8	32,6 ± 15,5	<0,001
ANK (%) 1:50	10,1 ± 11,5	24,3 ± 13,6	<0,001
ANK (%) 1:25	7,0 ± 9,3	16,3 ± 11,4	<0,001

Taula 6.C.2.2

ESTADIS DE RAI EN EL MOMENT DE L'ESTUDI EN RELACIO AMB L'ANK TEORICA

	ESTADI DE RAI					p
	0 (n=34)	I (n=16)	II (n=10)	III (n=2)	IV (n=5)	
PROPORCIO D:E						
1:800	32,0±21,6	30,3±19,4	32,5±29,7	9,3± 9,3	12,2±11,1	NS
1:400	26,8±18,2	25,1±18,7	26,3±25,0	7,8± 6,8	10,9± 9,3	NS
1:200	21,2±15,7	19,6±16,4	20,6±21,0	5,9± 3,9	9,3± 7,5	NS
1:100	15,8±13,9	14,1±13,5	15,7±17,6	4,3± 1,2	6,8± 5,8	NS
1:50	11,3±12,3	9,2± 9,5	11,8±14,7	3,2± 0,6	5,0± 4,8	NS
1:25	8,0±10,7	5,9± 6,5	7,5±10,7	2,6± 1,7	3,9± 3,7	NS
LEUCOCITS	44,3±54,8	36,2±33,0	35,9±42,3	81,3± 3,4	92,9±74,9	#
LIMFOCITS	34,6±46,5	27,6±29,7	31,5±40,9	69,4± 3,3	77,5±64,2	##
LGG	0,8± 0,5 (31)	0,7± 0,6 (14)	0,4± 0,4 (8)	1,0± 0,5 (2)	1,0± 2,4 (4)	NS

NS= no significatiu

# I vs IV p=0,02

## 0 vs IV p=0,05, I vs IV p=0,02



Taula 6.C.2.3

RELACIO ENTRE L'ANK I ELS ESTADIS DE RAI EN EL MOMENT DE L'ESTUDI AGRUPATS EN POC AVANÇAT (0), INTERMEDIS (I,II) I AVANÇAT (III,IV)

	ESTADI DE RAI			p
	PRECOÇ (n=34)	INTERMEDI (n=26)	AVANÇAT (n=7)	
PROPORCIO D:E				
1:800	32,0 ± 21,6	31,1 ± 23,3	11,3 ± 9,9	*0,02 **0,04
1:400	26,8 ± 18,2	25,5 ± 20,9	10,0 ± 8,2	*0,02
1:200	21,2 ± 15,7	20,0 ± 17,9	8,3 ± 6,5	NS
1:100	15,7 ± 13,9	14,7 ± 14,9	6,1 ± 5,0	NS
1:50	11,3 ± 12,3	10,2 ± 11,6	4,4 ± 4,0	NS
1:25	8,0 ± 10,7	6,5 ± 8,2	3,5 ± 3,2	NS
LEUCOCITS	44,3 ± 54,8	36,1 ± 36,0	89,6 ± 61,4	*0,05 **0,006
LIMFOCITS	34,6 ± 46,5	27,5 ± 32,5	75,2 ± 52,6	*0,04 **0,005
LGG	0,8 ± 0,5 (31)	0,6 ± 0,5 (22)	1,3 ± 1,9 (6)	NS

NS= no significatiu

\* significació entre precoç i avançat

\*\* significació entre intermedi i avançat

Taula 6.C.2.4

RELACIO ENTRE ELS ESTADIS DE BINET EN EL MOMENT NK I L'ANK

ESTADIS DE BINET				
	A (n=51)	B (n=9)	C (n=7)	p
PROPORCIO D:E				
1:800	30,5 ± 21,5	37,8 ± 26,0	11,3 ± 9,9	*0,02 **0,02
1:400	24,5 ± 18,6	30,6 ± 23,2	10,0 ± 8,2	**0,04
1:200	20,1 ± 15,9	23,8 ± 20,8	8,3 ± 6,5	NS
1:100	15,0 ± 13,6	17,3 ± 18,1	6,1 ± 5,0	NS
1:50	10,1 ± 11,4	11,5 ± 15,0	4,4 ± 4,0	NS
1:25	7,3 ± 9,4	7,8 ± 11,4	3,5 ± 3,2	NS
LEUCOCITS	39,9 ± 47,0	45,1 ± 52,1	89,6 ± 61,4	*0,01
LIMFOCITS	30,6 ± 40,0	36,7 ± 48,0	75,2 ± 52,6	*0,01
LGG	0,8 ± 0,5 (44)	0,5 ± 0,6 (9)	1,3 ± 1,9 (6)	NS

NS= no significatiu

\* significatiu entre estadi A i C

\*\* significatiu entre estadi B i C

Taula 6.C.2.5

Relació entre les xifres de leucòcits i limfòcits amb l'ANK teòrica (n=67).

	Leucòcits		Limfòcits	
	r	p	r	p
PROPORCIO D:E				
1:800	-0,367	0,002	-0,364	0,002
1:400	-0,363	0,002	-0,363	0,002
1:200	-0,355	0,003	-0,357	0,003
1:100	-0,331	0,006	-0,336	0,005

Taula 6.C.2.6

RELACIO ENTRE L'ANK I EL GRAU DE LIMFOCITOSI EN EL MOMENT DE L'ESTUDI

	LIMFOCITS $\leq 50 \times 10^9/L$ (n=53)	LIMFOCITS $> 50 \times 10^9/L$ (n=14)	p
1:800	34,5 $\pm$ 21,6	10,6 $\pm$ 10,9	0,0002
1:400	28,6 $\pm$ 19,1	9,0 $\pm$ 7,0	0,0004
1:200	22,6 $\pm$ 16,8	7,3 $\pm$ 3,9	0,0013
1:100	16,8 $\pm$ 14,5	5,1 $\pm$ 3,0	0,0039
1:50	11,8 $\pm$ 12,2	3,6 $\pm$ 3,4	0,0161
1:25	8,0 $\pm$ 10,0	3,0 $\pm$ 3,9	0,0741
	LIMFOCITS $\leq 30 \times 10^9/L$ (n=44)	LIMFOCITS $> 30 \times 10^9/L$ (n=23)	p
1:800	34,2 $\pm$ 20,0	20,5 $\pm$ 23,4	0,0145
1:400	28,9 $\pm$ 18,8	16,2 $\pm$ 17,0	0,0086
1:200	23,2 $\pm$ 17,1	12,0 $\pm$ 11,6	0,0066
1:100	17,6 $\pm$ 15,1	8,2 $\pm$ 8,0	0,0075
1:50	12,6 $\pm$ 13,0	5,4 $\pm$ 5,5	0,0143
1:25	8,6 $\pm$ 10,7	3,7 $\pm$ 4,0	0,0388
	LIMFOCITS $\leq 15 \times 10^9/L$ (n=26)	LIMFOCITS $> 15 \times 10^9/L$ (n=41)	p
1:800	35,5 $\pm$ 21,8	25,7 $\pm$ 21,6	0,0779
1:400	29,3 $\pm$ 20,6	21,5 $\pm$ 17,5	0,1009
1:200	24,4 $\pm$ 18,9	16,2 $\pm$ 13,5	0,0438
1:100	19,3 $\pm$ 16,8	11,2 $\pm$ 10,5	0,0184
1:50	14,0 $\pm$ 14,7	7,7 $\pm$ 8,1	0,0266
1:25	9,8 $\pm$ 12,6	5,2 $\pm$ 5,8	0,0415

Taula 6.C.2.7

ANK dels pacients en relació amb la xifra de LGG de la SP

LIMFOCITS GRANS GRANULATS			
	<0,5(x10 <sup>9</sup> /L)	>0,5(x10 <sup>9</sup> /L)	p
PROPORCIO D:E			
1:800	26,6 ± 23,7 (23)	34,6 ± 21,4 (36)	NS
1:400	20,6 ± 17,7 (23)	29,6 ± 19,9 (36)	NS
1:200	15,2 ± 13,1 (23)	24,1 ± 18,0 (36)	0,04
1:100	10,4 ± 10,1 (23)	18,6 ± 15,9 (36)	0,03
1:50	6,9 ± 7,8 (23)	13,7 ± 13,4 (36)	0,03
1:25	4,0 ± 4,8 (23)	9,9 ± 11,2 (36)	0,02

Taula 6.C.2.8

RELACIO ENTRE L'ANK I EL PERCENTATGE MITJA DE LES POBLACIONS LIMFOCITARIES T CD2<sup>+</sup> I CD4<sup>+</sup>

	LIMFOCITS CD2 <sup>+</sup>		LIMFOCITS CD4 <sup>+</sup>	
	CD2 ≤21,6% n=27	CD2 >21,6% n=12	CD4 ≤9,3% n=35	CD4 >9,3% n=15
1:800 p	22,9 ± 18,9	43,0 ± 28,2 0,01	21,6 ± 17,7	43,1 ± 26,0 0,001
1:400 p	18,2 ± 15,2	36,5 ± 25,6 0,008	17,2 ± 13,3	35,5 ± 24,6 0,001
1:200 p	14,4 ± 11,7	30,1 ± 23,7 0,008	12,9 ± 9,9	29,4 ± 22,0 0,0006
1:100 p	10,5 ± 9,1	24,2 ± 21,3 0,007	8,8 ± 7,6	23,2 ± 19,6 0,0004
1:50 p	7,4 ± 7,5	18,2 ± 18,8 0,01	5,8 ± 6,3	17,3 ± 17,2 0,001
1:25 p	5,6 ± 6,2	13,1 ± 16,4 0,04	4,2 ± 5,3	12,3 ± 14,9 0,007

Taula 6.C.2.9

Relació entre l'ANK i la xifra mitjà de limfòcits que expressen antigens *natural killer*

	LIMFOCITS CD11B		LIMFOCITS CD16		LIMFOCITS CD57	
	CD11b ≤ 8,4% n=34	CD11b > 8,4% n=16	CD16 ≤ 4,3% n=40	CD16 > 4,3% n=10	CD57 ≤ 5,6% n=36	CD57 > 5,6% n=4
1:800	21,3 ± 18,4	42,3 ± 24,5	23,1 ± 18,9	47,5 ± 26,5	22,7 ± 18,9	41,7 ± 26,0
p	0,001		0,001		0,006	
1:400	17,2 ± 14,1	34,5 ± 23,3	18,5 ± 15,6	39,6 ± 23,6	18,9 ± 15,6	32,5 ± 24,2
p	0,002		0,001		0,02	
1:200	12,8 ± 10,4	28,6 ± 11,2	14,3 ± 12,5	32,0 ± 22,1	14,8 ± 13,0	25,7 ± 11,3
p	0,0008		0,001		0,03	
1:100	8,5 ± 7,6	22,8 ± 19,0	10,1 ± 9,9	25,1 ± 20,8	10,6 ± 11,4	19,5 ± 17,9
p	0,0004		0,001		0,04	
1:50	5,7 ± 6,1	16,8 ± 17,0	6,8 ± 8,0	18,9 ± 18,9	7,5 ± 10,8	13,7 ± 13,7
p	0,001		0,003		NS	
1:25	4,0 ± 5,0	12,0 ± 14,7	4,8 ± 6,3	13,8 ± 17,0	5,7 ± 9,8	8,9 ± 10,0
p	0,006		0,009		NS	

## B. POBLACIONS LIMFOCITÀRIES

### 1. COMPARACIO AMB VALORS CONTROLS

La comparació de la distribució de les poblacions limfocitàries de pacients i controls s'observa en la taula 6.C.3.1. Els valors percentuals de les poblacions limfocitàries T i NK estan disminuïts respecte dels controls, mentre que el percentatge de limfòcits B està augmentat. Quan s'analitza el valor absolut de les diverses poblacions limfocitàries s'observa que els pacients amb LLC-B no sols tenen més limfòcits B que la població control sinó que les xifres absolutes de limfòcits T i NK també són superiors a la del grup control (taula 6.C.3.1).

La relació entre limfòcits CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> no difereix dels valors control. En canvi el quocient CD2/CD19 està molt disminuït en els pacients amb LLC-B respecte dels valors normals (1,5±4,1 vs 8,6±3,3; p<0,001). També existeixen diferències en els quocients CD16/CD2 i CD16/CD8, que són més elevats en malalts que en controls (taula 6.C.3.2).

L'anàlisi de la coexpressió d'antígens NK amb antígens de línia T posa de manifest que existeix un increment percentual de la població CD16<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> en els malalts amb LLC-B, mantenint dintre de la normalitat les poblacions CD16<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup>. Quan l'anàlisi es realitza en valors absoluts, s'observa un increment en la població CD16<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup> (taula 6.C.3.3).



## 2. POBLACIONS LIMFOCITÀRIES I CARACTERÍSTIQUES DELS PACIENTS

### 2.a. Característiques clíniques i estadis clínics.

No s'ha observat diferències en les poblacions limfocitàries en funció de les característiques clíniques dels pacients (edat, sexe, presència d'adenopaties o visceromegàlies).

La classificació per estadis clínics de Rai o Binet no ha mostrat diferències respecte de la distribució percentual de les diverses poblacions T, NK i B. La xifra absoluta de cadascuna de les poblacions limfocitàries mostra diferències significatives segons l'estadi clínic de Rai o de Binet. Els estadis més avançats de Rai (III i IV) tenen una major quantitat de limfòcits CD4<sup>+</sup> (p=0,05), CD2<sup>+</sup> (p=0,0007) o CD19<sup>+</sup> (p=0,027) que la resta d'estadis (taula 6.C.3.4). Els valors de les poblacions limfocitàries es comporten de forma similar al considerar la classificació de Binet (taula 6.C.3.5).

La pertinença o no al grup de LLC-B quiescent no comporta una distribució diferent de les poblacions limfocitàries, considerades tant de forma percentual com absoluta. La similitud en les poblacions limfocitàries es manté tant si es considera el grup amb LLC-B quiescent contra la resta de malalts com si es considera el grup amb LLC-B quiescent *versus* el grup no quiescent en estadi A. Nogensmenys, quan s'analitza el nombre total de limfòcits CD19<sup>+</sup> s'observen diferències significatives entre el grup amb LLC-B quiescent i els malalts amb LLC-B no-quiescent en estadi A: els pacients en estadi A quiescent tenen menys població CD19<sup>+</sup> respecte dels malalts en estadi A no quiescents ( $14,4 \times 10^9/L \pm 10,0$  vs  $52,45 \times 10^9/L \pm 63,4$ ; p=0,040).

Els quocients limfocitaris no mostren diferències **significatives** segons l'estadi clínic seguint de la classificació de Rai o **Binet**, o el fet de

pertànyer al grup amb LLC-B quiescent.

## 2.b. Dades analítiques

Les poblacions limfocitàries, tant en valors percentuals com en absoluts, tenen relació amb la leucocitosi i la limfocitosi en el moment de l'estudi de citotoxicitat. El signe de la relació difereix quan es consideren les poblacions en valor percentual, on les poblacions T i NK tenen una relació inversa amb la xifra de limfòcits i leucòcits, o quan es consideren les poblacions en valor absolut, llavors el sentit de la relació és directe (taula 6.C.3.6). També s'ha observat relació directa entre la xifra de limfòcits CD16<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (n=33, r=0,530, p=0,001), de limfòcits CD16<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> (n=33, r=0,599, p<0,001) i de limfòcits CD11b<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup> (n=11, r=0,809, p<0,001) i la xifra total de limfòcits.

Els quocients limfocitàris no mostren diferències significatives respecte de la xifra de limfòcits.

No s'ha observat relació entre el percentual de les diverses poblacions limfocitàries i el nombre de LGG. Nogensmenys, existeixen diferències significatives en el nombre absolut de limfòcits CD16<sup>+</sup> ( $1,2 \times 10^9/L \pm 1,8$  vs  $0,5 \times 10^9/L \pm 0,6$ ; p=0,04), CD11b<sup>+</sup> ( $2,8 \times 10^9/L \pm 3,7$  vs  $1,3 \times 10^9/L \pm 1,2$ ; p=0,04) i CD57<sup>+</sup> ( $1,8 \times 10^9/L \pm 2,6$  vs  $0,8 \times 10^9/L \pm 0,8$ ; p=0,05) entre el grup de pacients amb menys de  $0,5 \times 10^9/L$  LGG i el grup amb major nombre de LGG.

No s'han observat diferències significatives en la xifra, percentual o absoluta, de les diverses poblacions limfocitàries quan s'analitza la xifra de gammaglobulina ni de les diverses immunoglobulines, excepte pel que respecta als nivells d'Ig A actuals. El grup de **pacients amb** uns nivells d'Ig A superior a 60 mg/mL tenen un nombre **menor absolut** de limfòcits CD19<sup>+</sup> (n=16,  $15,3 \times 10^9/L \pm 13,4$  vs n=3,  $97,4 \times 10^9/L \pm 47,0$ ;

$p < 0,0001$ ), així com un menor nombre de limfòcits  $CD2^+$  ( $n=17$   $3,0 \times 10^9/L \pm 1,9$  vs  $n=3$ ,  $8,8 \times 10^9/L \pm 5,5$ ;  $p=0,0022$ ).

El tipus histològic d'afectació medullar per la LLC-B comporta diferències en el nombre absolut de la subpoblació limfocitària  $CD4^+$ . El patró histològic difús té un major nombre de limfòcits  $CD4$  que el patró nodular o mixte ( $3,9 \times 10^9/L \pm 1,6$  vs  $1,3 \times 10^9/L \pm 1,0$  i  $2, \times 10^9/L \pm 1,2$  respectivament).

La distribució de pacients segons el TDL no condiciona diferències, ni percentuals ni absolutes, en les diverses poblacions limfocitàries ni en els quocients. S'observen diferències, que no assoleixen significació estadística, en el percentatge de limfòcits  $CD4^+$  i en el quocient  $CD4/CD8$ . Els malalts amb un TDL superior als 12 mesos ( $n=30$ ) tendeixen a tenir un major percentatge de limfòcits  $CD4^+$  ( $11,1\% \pm 10,4$  vs  $5,6\% \pm 4,9$ ;  $p=0,06$ ) i un quocient  $CD4/CD8$  més elevat ( $2,5 \pm 1,4$  vs  $1,8 \pm 1,1$ ;  $p=0,07$ ) que els pacients amb un TDL inferior als 12 mesos ( $n=14$ ).

Taula 6.C.3.1

Comparació entre les poblacions limfocitàries (% i  $\times 10^9/L$ ) dels pacients i les dels controls (n)

	PACIENTS	CONTROLS	p
<b>VALORS PERCENTUALS</b>			
CD2	21,6 $\pm$ 20,1 (44)	74,5 $\pm$ 7,6 (29)	<0,001
CD4	9,3 $\pm$ 9,4 (56)	43,4 $\pm$ 8,5 (32)	<0,001
CD8	5,2 $\pm$ 5,5 (56)	21,9 $\pm$ 5,8 (32)	<0,001
CD16	4,3 $\pm$ 8,3 (56)	8,1 $\pm$ 3,9 (32)	0,015
CD57	5,6 $\pm$ 7,1 (56)	9,2 $\pm$ 5,9 (32)	0,016
CD11b	8,4 $\pm$ 10,3 (56)	19,1 $\pm$ 6,3 (32)	<0,001
CD56	4,1 $\pm$ 10,3 (17)	10,1 $\pm$ 6,6 (16)	0,057
CD19	65,4 $\pm$ 28,0 (42)	9,8 $\pm$ 3,8 (28)	<0,001
<b>VALORS ABSOLUTS</b>			
CD2	4,1 $\pm$ 3,6 (44)	1,5 $\pm$ 0,5 (27)	<0,001
CD4	1,9 $\pm$ 1,5 (56)	0,9 $\pm$ 0,4 (32)	<0,001
CD8	1,2 $\pm$ 1,7 (56)	0,4 $\pm$ 0,2 (32)	0,01
CD16	0,8 $\pm$ 1,2 (56)	0,2 $\pm$ 0,1 (32)	0,006
CD57	1,2 $\pm$ 1,7 (56)	0,2 $\pm$ 0,2 (32)	0,001
CD11b	1,8 $\pm$ 2,4 (56)	0,4 $\pm$ 0,2 (32)	0,001
CD56	0,6 $\pm$ 0,8 (17)	0,2 $\pm$ 0,1 (15)	NS
CD19	31,8 $\pm$ 44,8 (42)	0,2 $\pm$ 0,1 (27)	<0,001

Taula 6.C.3.2

Comparació entre els quocients limfocitaris dels pacients i dels controls (n)

	PACIENTS	CONTROLS	p
CD4/CD8	2,3 ± 1,3 (56)	2,1 ± 0,7 (32)	NS
CD2/CD19	1,5 ± 4,1 (42)	8,6 ± 3,3 (27)	<0,001
CD16/CD2	0,2 ± 0,2 (44)	0,1 ± 0,05 (28)	0,01
CD16/CD8	0,9 ± 1,1 (56)	0,4 ± 0,2 (32)	0,01
CD16/CD57	0,9 ± 0,8 (56)	1,0 ± 0,5 (32)	NS
CD16/CD11b	0,5 ± 0,4 (54)	0,4 ± 0,2 (32)	NS
CD16/CD56	1,2 ± 1,9 (15)	0,9 ± 0,4 (15)	NS

Taula 6.C.3.3

Comparació entre els valors de les poblacions limfocitàries definides per dos determinants antigènics dels pacients i dels controls. (n)

	PACIENTS	CONTROLS	p
VALORS PERCENTUALS			
CD16 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	10,2 ± 9,5 (34)	8,1 ± 6,7 (25)	NS
CD16 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	25,7 ± 14,1 (33)	30,0 ± 13,3 (24)	NS
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	47,5 ± 20,5 (33)	36,0 ± 20,4 (24)	0,04
CD11b <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	62,5 ± 15,5 (56)	63,7 ± 14,4 (32)	NS
CD56 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	59,1 ± 21,7 (10)	70,0 ± 10,6 (14)	NS
VALORS ABSOLUTS			
CD16 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0,08 ± 0,28 (33)	0,01 ± 0,02 (24)	NS
CD16 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,18 ± 0,23 (32)	0,06 ± 0,05 (23)	0,02
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,54 ± 1,18 (32)	0,08 ± 0,09 (23)	NS
CD11b <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	1,12 ± 1,12 (16)	0,23 ± 0,10 (18)	0,002
CD56 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	0,61 ± 0,70 (9)	0,08 ± 0,07 (15)	0,007

Taula 6.C.3.4

POBLACIONS LIMFOCITARIES ( $\times 10^9/L$ ) SEGONS ESTADI DE RAI AGRUPANT ELS MALALTS EN ESTADI PRECOÇ (0,I,II) O AVANÇAT (III,IV) (n)

	ESTADI DE RAI		p
	PRECOÇ	AVANÇAT	
CD4	1,7 $\pm$ 1,2 (50)	3,4 $\pm$ 2,4 (6)	0,05
CD8	1,0 $\pm$ 1,6 (50)	2,3 $\pm$ 1,9 (6)	NS
CD16	0,8 $\pm$ 1,2 (50)	0,6 $\pm$ 0,5 (6)	NS
CD57	1,1 $\pm$ 1,7 (50)	1,7 $\pm$ 1,2 (6)	NS
CD11b	1,8 $\pm$ 2,5 (50)	1,9 $\pm$ 1,2 (6)	NS
CD2	3,5 $\pm$ 3,1 (40)	9,5 $\pm$ 3,0 (4)	0,0007
CD19	26,4 $\pm$ 41,1 (38)	77,3 $\pm$ 54,4 (4)	0,03
CD56	0,4 $\pm$ 0,6 (14)	1,6 $\pm$ 0,7 (3)	0,009

Taula 6.C.3.5

POBLACIONS LIMFOCITÀRIES ( $\times 10^9/L$ ) SEGONS L'ESTADI DE BINET

	ESTADI DE BINET			p
	A	B	C	
CD4	1,7 $\pm$ 1,3 (42)	1,4 $\pm$ 1,2 (8)	3,4 $\pm$ 2,4 (6)	*0,01 **0,06
CD8	1,1 $\pm$ 1,8 (42)	0,6 $\pm$ 0,4 (8)	2,3 $\pm$ 1,9 (6)	NS
CD16	0,8 $\pm$ 1,3 (42)	0,5 $\pm$ 0,5 (8)	0,6 $\pm$ 0,5 (6)	NS
CD57	124 $\pm$ 1,9 (42)	0,7 $\pm$ 0,5 (8)	1,7 $\pm$ 1,2 (6)	NS
CD11b	1,8 $\pm$ 2,6 (42)	1,8 $\pm$ 1,9 (8)	1,9 $\pm$ 1,2 (6)	NS
CD2	3,6 $\pm$ 3,3 (34)	2,8 $\pm$ 2,1 (6)	9,5 $\pm$ 3,0 (4)	*0,002 **0,003
CD19	27,1 $\pm$ 41,5 (32)	22,7 $\pm$ 42,5 (6)	77,3 $\pm$ 54,4 (4)	*0,03
CD56	0,3 $\pm$ 0,2 (10)	0,7 $\pm$ 1,1 (4)	1,6 $\pm$ 0,7 (3)	*<0,001



Taula 6.C.3.6

Relació entre la xifra de leucòcits ( $\times 10^9/L$ ) i limfòcits ( $\times 10^9/L$ ) i els valors de les diverses subpoblacions limfocitàries

	Leucòcits		Limfòcits	
	r	p	r	p
VALORS PERCENTUALS				
CD4 (n=56)	-0,404	0,002	-0,416	0,001
CD8 (n=56)	-0,328	0,013	-0,342	0,009
CD57 (n=56)	-0,311	0,019	-0,321	0,016
CD11b (n=56)	-0,312	0,019	-0,323	0,015
CD2 (n=44)	-0,424	0,004	-0,435	0,003
CD19 (n=42)	0,405	0,007	0,418	0,005
VALORS ABSOLUTS				
CD4 (n=56)	0,545	<0,001	0,539	<0,001
CD8 (n=56)	0,730	<0,001	0,695	<0,001
CD16 (n=56)	0,497	<0,001	0,464	<0,001
CD57 (n=56)	0,654	<0,001	0,616	<0,001
CD11b (n=56)	0,684	<0,001	0,654	<0,001
CD56 (n=17)	0,668	0,003	0,674	0,002
CD2 (n=44)	0,752	<0,001	0,736	<0,001
CD19 (n=42)	0,985	<0,001	0,993	<0,001

## SUPERVIVENCIA DELS MALALTS

En el moment de tancar l'estudi (6-6-90) quatre dels seixanta-set pacients (5,9%) eren morts. Un pacient va morir per transformació a limfoma d'alt grau i els altres tres per complicacions infeccioses. La mediana de seguiment des del moment del diagnòstic és de 32,2 mesos (extrems 1,7 a 151,1) i des de la realització de l'ANK és de 11,9 mesos (extrems 0,01-19,5). La mediana de supervivència no està assolida. Les corbes de supervivència des de la data del diagnòstic i des de la inclusió en l'estudi es reflexen a la gràfica 6.C.4.1. La probabilitat de supervivència a l'any des de la realització de l'estudi és del 95,5% amb uns intervals de confiança del 99,4% i 90,6%.

## ANALISI UNIVARIANT DELS FACTORS QUE INCIDEIXEN EN LA SUPERVIVENCIA

### A. Des del moment de la inclusió en l'estudi

Les variables amb influència en la supervivència dels malalts a l'anàlisi univariant són:

- la xifra de prolimfòcits inicials (p=0,004)
- la xifra de plaquetes inicials (p=0,02)
- l'estadi de Rai (p=0,01)
- l'estadi de Binet (p=0,005)
- l'ANK teòrica a proporció D:E 1:800 (p=0,02)
- l'ANK teòrica a proporció D:E 1:400 (p=0,02)
- l'ANK teòrica a proporció D:E 1:200 (p=0,02)
- l'ANK teòrica a proporció D:E 1:100 (p=0,03)
- els nivells d'Ig G inicials (p=0,01)
- els nivells d'Ig A inicials (p=0,02)

No es va poder analitzar la influència en la supervivència de temps de duplicació limfocitari ni dels valors, absoluts o percentuals, de les diverses poblacions limfocitàries, per l'escàs nombre de morts entre els malalts estudiats per aquests paràmetres. D'altra banda, no va morir cap pacient del grup amb LLC-B quiescent.

#### B. Des del moment del diagnòstic

En l'anàlisi univariada, les variables amb significat pronòstic a la supervivència són la xifra de plaquetes inicials, l'hemoglobina inicial i l'ANK:

■ plaquetes inicials	(p=0,05)
■ hemoglobina inicial	(p=0,05)
■ ANK	(p=0,07)

#### ANALISI MULTIVARIADA SOBRE ELS PARAMETRES AMB INFLUENCIA SOBRE LA SUPERVIVENCIA DELS MALALTS DE LA SERIE GLOBAL

##### A. Des del moment de la inclusió en l'estudi

En l'estudi no s'han inclòs les dades dels anticossos monoclonals perquè no hi ha cap malalt mort entre els que tenen estudi de poblacions limfocitàries.

Les variables amb valor predictiu sobre la supervivència dels malalts són (taula 6.C.4.1):

■ la xifra de plaquetes inicial	(p=0,008)
■ el valor d'hemoglobina inicial	(p=0,02)
■ ANK en la proporció D:E 1:100	(p=0,02)

## B. Des del moment del diagnòstic

Com en l'apartat anterior no s'han inclòs en l'estudi de la supervivència les dades obtingudes de les poblacions limfocitàries, per les raons anteriorment mencionades.

Analitzant la supervivència des del moment del diagnòstic, les variables amb significat pronòstic són (taula 6.C.4.2):

- la xifra de plaquetes inicial (p=0,05)
- el valor d'hemoglobina inicial (p=0,05)
- ANK en la proporció 1:100 (p=0,07)

## ANALISI UNIVARIADA I MULTI SOBRE ELS PARAMETRES AMB INFLUENCIA SOBRE LA SUPERVIVENCIA DEL MALALTS AMB LLC-B NO QUIESCENT

### A. Des del moment de la inclusió en l'estudi

L'anàlisi univariada i l'anàlisi multivariada han donat les mateixes variables amb influència pronòstica. En el grup de malalts amb LLC-B no quiescent les variables amb significat pronòstic respecte de la supervivència són les mateixes que en la sèrie global (taula 6.C.4.3), és a dir:

- la xifra de plaquetes inicial (p=0,01)
- la xifra d'hemoglobina inicial (p=0,05)
- l'ANK en la proporció D:E 1:100 (p=0,05)

## ANALISI DE LA PROGRESSIO DE LA MALALTIA

### 1. LIMFOCITOSI SUPERIOR A $50 \times 10^9/L$ DES DEL MOMENT DE LA INCLUSIO EN L'ESTUDI

Dels seixanta-set malalts de la sèrie global, catorze havien superat els  $50 \times 10^9/L$  limfòcits abans de la inclusió en l'estudi. L'anàlisi de la limfocitosi progressiva s'ha realitzat sobre els pacients restants.

L'estudi univariat i multivariat sobre els paràmetres amb influència en la limfocitosi progressiva són dos (taula 6.C.4.4):

- l'edat dels pacients (p=0,02)
- la limfocitosi en el moment de l'estudi (p=0,0007)

de manera que els malalts de més edat i amb major limfocitosi tenen més probabilitats de sobrepassar la xifra de  $50 \times 10^9/L$  limfòcits.

### 2. LIMFOCITOSI SUPERIOR A $50 \times 10^9/L$ DES DEL MOMENT DEL DIAGNOSTIC

Cap variable de les analitzades va tenir influència pronòstica en el desenvolupament d'una limfocitosi important tenint en compte la data del diagnòstic de la malaltia. Això està probablement relacionat amb el fet que els malalts amb més risc de progressar ja havien progressat abans de la seva inclusió en l'estudi.

### 3. PROGRESSIO D'ESTADI CLINIC SUPERIOR

Dels 36 malalts no tractats quatre (11,1%) van progressar. El temps de progressió a un estadi clínic superior va oscil·lar entre 0,8 i 16,3 mesos. Els canvis d'estadi van ser:

- De A(0) a A(I) ..... 2 pacients
- De A(0) a A(II) ..... 1 pacient
- De A(0) a C(IV) ..... 1 pacient

A l'anàlisi univariada i multi l'únic paràmetre amb influència sobre la progressió de la malaltia ha sigut la xifra del recompte plaquetari ( $p=0,05$ ).

Taula 6.C.4.1

Anàlisi multivariada sobre la supervivència dels malalts de la sèrie general des del moment de la inclusió en l'estudi.

	Coeficient	Log likelihood	X <sup>2</sup> global	p
Plaquetes inicials	0,0170	-10,0138	8,77	0,008
Hemoglobina inicial	-0,5517	-7,2516	13,33	0,02
ANK 1:100	-0,4299	-4,5555	15,14	0,02

Taula 6.C.4.2

Anàlisi multivariada dels factors amb influència sobre la supervivència des del diagnòstic de la malaltia

	Coeficient	Log likelihood	X <sup>2</sup> global	p
Plaquetes inicials	0,0104	-11,4538	4,77	0,05
Hemoglobina inicial	-0,3510	-9,5698	9,27	0,05
ANK 1:100	-0,0770	-7,9919	13,23	0,07



Taula 6.C.4.3

Anàlisi multivariada sobre la supervivència dels malalts amb LLC-B no quiescent de la sèrie general des del moment de la inclusió en l'estudi.

	Coeficient	Log likelihood	X <sup>2</sup> global	p
Plaquetes inicials	0,0147	-7,8791	8,96	0,01
Hemoglobina inicial	-0,4330	-6,1909	10,38	0,05
ANK 1:100	-0,3734	-4,4799	11,29	0,05

Taula 6.C.4.4

Anàlisi multivariada dels paràmetres amb influència sobre el desenvolupament de limfocitosi progressiva que superi els  $50 \times 10^9/L$

	Coeficient	Log likelihood	$\chi^2$ global	p
Limfòcits ( $\times 10^9/L$ )	0,1759	-7,6975	14,22	0,0007
Edat (anys)	0,1502	-4,9568	19,51	0,02

**Figura 6.C.4.1a**

**Corba actuarial de supervivència de la sèrie global: a) des del diagnòstic;  
b) des de la inclusió a l'estudi**

**Figura 6.C.4.1b**

**Corba actuarial de supervivència de la sèrie global en relació amb l'ANK  
a proporció D:E 1:100**

## ACTIVITAT NATURAL KILLER I POBLACIONS LIMFOCITÀRIES EN PACIENTS QUE NO HAN REBUT TRACTAMENT

De la sèrie global, trenta-sis pacients (53,7%) no havien rebut tractament fins el moment de l'estudi de citotoxicitat. L'edat mediana és de 72 anys (extrems de 30 a 92) amb una mitjà de 68,9 anys ( $\pm 13,2$ ). Divuit eren homes (50%) i divuit dones (50%).

L'estadi clínic inicial i en el moment de l'estudi era de forma predominant 0 (63,9% inicial i 61,1% en el moment de l'estudi) o A (83,3% en el moment inicial i en el de l'estudi). Setze malalts (50%) acomplien els criteris de LLC-B quiescent.

El temps de duplicació limfocitari era superior als 12 mesos en la majoria dels pacients (78,6%). En set pacients el TDL no es podia calcular per haver iniciat tractament abans dels tres mesos del diagnòstic (5 casos) o per pèrdua de control o exitus (2 casos).

Els valors dels paràmetres hematològics en el moment de l'estudi es mostren a la taula 6.D.1. La xifra mediana de limfòcits és de  $20,7 \times 10^9/L$  (5,3-235,2), amb una mitja de  $37,1 \times 10^9/L$  ( $\pm 45,7$ ). La infiltració limfocitària al mielograma era, per terme mig, de 57,1 % ( $\pm 24,9$ ). En la majoria dels malalts (89%) la infiltració limfocitària era superior al 30%. En trenta-un pacients es va realitzar BMO i el patró histològic predominant era el mixte (51,6%) seguit del nodular (38,7%).

La citotoxicitat, experimental i teòrica, desenvolupada pels malalts no tractats prèviament es recull en la taula 6.D.2. La citotoxicitat teòrica mitja a una proporció D:E 1:200 és de 18,8% ( $\pm 15,5$ ), amb una mediana de 11,9% (extrems entre 3% i 60,1%).

## ACTIVITAT NATURAL KILLER EN PACIENTS AMB LLC-B NO TRACTATS

### Comparació amb valors controls

Els pacients no tractats tenen una citotoxicitat, en cadascuna de les proporcions D:E, inferior als valors control (taula 6.D.3).

### ANK i característiques dels pacients

No s'observen diferències entre el grup de pacients no tractats prèviament i els tractats en la citotoxicitat teòrica desenvolupada en cadascuna de les proporcions D:E.

De forma similar al que succeix en la sèrie global, l'ANK que desenvolupen els pacients amb LLC-B no tractats no té relació amb les principals característiques clíniques dels pacients, l'estadi clínic segons la classificació de Rai i de Binet, el patró de BMO, l'estat quiescent de la malaltia ni el TDL. Els pacients en estadi C en el moment de l'estudi desenvolupen una citotoxicitat teòrica a 1:200 de 8,1% ( $\pm 0,8$ ) *versus* 19,5% ( $\pm 15,7$ ) en la resta de malalts. La manca de significació es pot atribuir al fet que únicament hi ha dos pacients en estadi C que no han rebut tractament.

La relació que s'observa en la sèrie global entre l'ANK i la limfocitosi no es reproduïx en aquest grup de malalts, possiblement per l'escàs nombre de pacients. No obstant, la xifra de  $50 \times 10^9/L$  limfòcits permet delimitar dos grups de pacients amb citotoxicitat diferent (taula 6.D.4). Finalment, el nombre de LGG mostra relació directa amb l'ANK desenvolupada a les proporcions D:E més baixes (D:E 1:25,  $n=34$ ,  $r=0,344$ ,  $p=0,05$ ). La xifra de  $0,5 \times 10^9/L$  LGG permet definir dos grups de pacients amb una citotoxicitat diferent a les proporcions D:E de 1:200 fins a 1:25 (taula 6.D.5).

En els malalts no tractats s'observa una relació directa entre la citotoxicitat teòrica a 1:800 i el percentatge de limfòcits CD16, CD11b

( $r=0,34$  i  $r=0,37$ ,  $p<0,05$ ). La xifra de limfòcits CD16+CD4+ **mostra** relació directa amb l'ANK teòrica a les proporcions 1:800, 1:400 i 1:200 ( $r$  al voltant de 0,5 i  $p<0,05$ ).

## POBLACIONS LIMFOCITÀRIES

### Comparació amb valors control

La xifra de cadascuna de les poblacions limfocitàries i dels diversos quocients limfocitaris d'aquest grup de pacients es mostra a la taula 6.D.6, 6.D.7 i 6.D.8. Les xifres mitjes absolutes de les diverses poblacions T són les següents: CD2  $3,9 \times 10^9/L$  ( $\pm 3,4$ ), CD4  $2,1 \times 10^9/L$  ( $\pm 1,3$ ), CD8  $1,2 \times 10^9/L$  ( $\pm 1,9$ ); de les poblacions amb antígens NK: CD57  $1,3 \times 10^9/L$  ( $\pm 2,0$ ), CD16  $0,9 \times 10^9/L$  ( $\pm 1,4$ ), CD11b  $2,0 \times 10^9/L$  ( $\pm 2,8$ ); i de la població B: CD19  $29,1 \times 10^9/L$  ( $\pm 42,9$ ).

Els pacients no tractats tenen un major nombre de limfòcits T (CD2, CD4 i CD8), NK (CD16, CD57 i CD11b) i B (CD19) que els controls (taula 6.D.9). Les taules 6.D.10 i 6.D.11 comparen els valors dels quocients limfocitaris i de les dobles poblacions de pacients i controls. S'observen uns valors significativament diferents en els quocients CD2/CD19, CD16/CD8 i CD16/CD2 respecte dels controls.

### Poblacions limfocitàries i característiques dels pacients

No s'han observat diferències en la xifra de limfòcits o el valor absolut de les diverses poblacions limfocitàries entre els malalts tractats i els no tractats. L'única diferència significativa s'observa en el quocient CD2/CD19, que és més gran en el grup tractat prèviament ( $n=13$ ,  $3,5 \pm 6,9$  vs  $n=31$ ,  $0,6 \pm 1,1$ ;  $p=0,027$ ). Aquest fet també es dona quan es compara el grup que no reb tractament amb el grup que n'està **rebent** ( $n=34$ ,  $0,9 \pm 2,2$  vs  $n=8$  respectivament,  $4,1 \pm 8,1$ ;  $p=0,0464$ ).

Les poblacions limfocitàries, valors absolut o relatiu, dels pacients no tractats mostren relació amb la xifra de leucòcits, limfòcits i LGG ( $r$

entre 0,4 i 0,9 i p entre 0,5 i <0,001).

Els estudis de correlació entre les poblacions limfocitàries i les diverses característiques clíniques dels trenta-sis malalats no tractats mostren relació directa entre el quocient CD16/CD2 i la xifra de gammaglobulina ( $r=0,356$ ,  $p=0,05$ ); el quocient CD16/CD8 i la xifra d'Ig G actual ( $r=-0,593$ ,  $p=0,02$ ), el quocient CD16/CD11b i la xifra d'Ig G ( $r=-0,711$ ,  $p=0,003$ ) i d'Ig A actuals ( $r=-0,623$ ,  $p=0,016$ ). També existeix una relació directa entre la xifra de limfòcits CD4<sup>+</sup> i el percentatge d'infiltració a moll d'os ( $r=0,519$ ,  $p=0,03$ ).

No s'han observat diferències estadísticament significatives en la distribució de les poblacions limfocitàries respecte del sexe ni respecte de l'estadi clínic de Rai i de Binet.

Taula 6.D.1

Estadística descriptiva dels principals paràmetres hematològics en el moment de l'estudi de citotoxicitat

Paràmetre*	Mitja± D.S.	Mediana	Extrems	n
Leucòcits	47,9 ± 53,7	30,0	9,5-294,0	36
Limfòcits	37,1 ± 45,7	20,7	5,3-235,0	36
LGG <sup>°</sup>	0,8 ± 0,5	0,8	0 - 1,9	32
Neutròfils	7,0 ± 6,9	5,2	1,8- 35,3	36
Monòcits	1,0 ± 1,9	0,6	0 - 11,8	36
Centròcits	1,0 ± 2,2	0	0 - 11,8	36
Centroblasts	0,4 ± 0,9	0	0 - 4,2	36
Prolimfòcits	0,05± 0,3	0	0 - 1,8	36

\* Els valors de leucòcits estan expressats en  $\times 10^9/L$

<sup>°</sup> LGG = limfòcit gran granulat



Taula 6.D.2

## Resultats de l'estudi de citotoxicitat

Proporció D:E	Mitja $\pm$ D.S.	Mediana	Extrems	n
<b>ANK EXPERIMENTAL (%)</b>				
1:800	27,6 $\pm$ 17,1	26,8	7,5 - 66,4	23
1:400	20,4 $\pm$ 16,6	11,0	4,0 - 61,2	30
1:200	17,8 $\pm$ 14,0	11,9	3,8 - 53,6	33
1:100	13,4 $\pm$ 12,1	7,9	3,8 - 53,6	35
1:50	9,2 $\pm$ 9,6	4,1	0,3 - 31,9	25
<b>ANK TEORICA (%)</b>				
1:800	28,2 $\pm$ 21,7	23,2	4,3 - 90,2	36
1:400	23,3 $\pm$ 18,7	18,4	4,0 - 68,5	36
1:200	18,8 $\pm$ 15,5	11,9	3,0 - 60,1	36
1:100	14,2 $\pm$ 12,5	8,4	0,3 - 44,9	36
1:50	10,2 $\pm$ 10,1	5,1	0 - 33,7	36
1:25	7,2 $\pm$ 7,6	3,5	0 - 26,5	36

Taula 6.D.3

Comparació entre l'activitat natural killer teòrica dels pacients no tractats i dels controls

	PACIENTS (n=36)	CONTROLS (n=54)	p
ANK (%) 1:800	28,2 ± 21,7	---	
ANK (%) 1:400	23,3 ± 18,7	---	
ANK (%) 1:200	18,8 ± 15,5	40,2 ± 17,4	<0,001
ANK (%) 1:100	14,2 ± 12,5	32,6 ± 15,5	<0,001
ANK (%) 1:50	10,2 ± 10,1	24,3 ± 13,6	<0,001
ANK (%) 1:25	7,2 ± 7,6	16,3 ± 11,4	<0,001

Taula 6.D.4

Citotoxicitat desenvolupada per pacients amb LLC-B no tractada segons la xifra de limfòcits totals

	LIMFOCITS		p
	$\leq 50 \times 10^9 / L$	$> 50 \times 10^9 / L$	
PROPORCIO D:E			
1:800	31,8 $\pm$ 21,9 (29)	13,5 $\pm$ 14,4 (7)	0,05
1:400	26,3 $\pm$ 19,2 (29)	10,8 $\pm$ 8,6 (7)	0,05
1:200	21,4 $\pm$ 16,1 (29)	8,3 $\pm$ 4,2 (7)	0,04
1:100	16,3 $\pm$ 13,1 (29)	5,8 $\pm$ 3,9 (7)	0,04
1:50	11,7 $\pm$ 10,6 (29)	4,3 $\pm$ 4,6 (7)	NS
1:25	8,0 $\pm$ 8,0 (29)	3,7 $\pm$ 5,0 (7)	NS

Taula 6.D.5

ANK exercida pels pacients segons la xifra de LGG que tenen a SP

	LIMFOCITS GRANS GRANULATS		p
	$\leq 0,5 \times 10^9/L$	$< 0,5 \times 10^9/L$	
PROPORCIO D:E			
1:800	22,9 $\pm$ 24,0 (12)	33,6 $\pm$ 20,4 (20)	NS
1:400	17,5 $\pm$ 17,6 (12)	28,4 $\pm$ 19,1 (20)	NS
1:200	12,8 $\pm$ 12,6 (12)	23,9 $\pm$ 16,6 (20)	0,05
1:100	9,0 $\pm$ 9,7 (12)	18,8 $\pm$ 13,6 (20)	0,04
1:50	6,5 $\pm$ 8,4 (12)	13,8 $\pm$ 10,8 (20)	0,05
1:25	4,1 $\pm$ 4,7 (12)	10,0 $\pm$ 8,5 (20)	0,03

Taula 6.D.7

## Poblacions limfocitàries dels pacients en el moment de l'estudi

Població	Mitja $\pm$ D.S.	Mediana	Extrems	n
CD2	3,9 $\pm$ 3,4	3,0	0,80 - 18,8	31
CD4	2,1 $\pm$ 1,3	1,9	0,21 - 4,7	34
CD8	1,2 $\pm$ 1,9	0,9	0,15 - 11,8	34
CD16	0,9 $\pm$ 1,4	0,4	0,02 - 7,1	34
CD11b	2,0 $\pm$ 2,8	1,2	0 - 16,5	34
CD57	1,3 $\pm$ 2,0	0,8	0,10 - 11,8	34
CD56	0,4 $\pm$ 0,5	0,4	0 - 1,7	11
CD19	29,1 $\pm$ 42,9	17,4	1,08- 188,2	29

Les xifres de cadascuna de les poblacions estan expresades per  $10^9/L$

Taula 6.D.7

## DISTRIBUCIO DELS QUOCIENTS ENTRE LES DIVERSES POBLACIONS LIMFOCITARIES

Quocient	Mitja $\pm$ D.S.	Mediana	Extrems	n
CD4/CD8	2,4 $\pm$ 1,2	2,3	0,40 - 5,5	34
CD2/CD19	0,6 $\pm$ 1,1	0,2	0,03 - 4,5	29
CD16/CD2	0,2 $\pm$ 0,1	0,2	0,01 - 0,5	31
CD16/CD8	0,9 $\pm$ 0,7	0,6	0,03 - 3,3	34
CD16/CD57	0,9 $\pm$ 0,8	0,7	0,02 - 4,3	34
CD16/CD11b	0,5 $\pm$ 0,4	0,4	0,01 - 8,0	33
CD16/CD56	1,6 $\pm$ 2,4	1,0	0,07 - 8,0	9

Taula 6.D.8

DISTRIBUCIO DELS QUOCIENTS ENTRE LES DIVERSES POBLACIONS LIMFOCITARIES

Quocient	Mitja ± D.S.	Mediana	Extrems	n
VALORS PERCENTUALS				
CD16 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	9,9 ± 10,4	8,0	0,01 - 38,0	23
CD16 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	27,7 ± 12,4	29,0	6,0 - 58,2	24
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	46,1 ± 19,7	43,4	18,0 - 92,4	24
CD11b <sup>+</sup> /CD2 <sup>+</sup>	60,3 ± 15,7	63,0	27,5 - 84,0	12
CD56 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	57,8 ± 14,5	59,5	35,4 - 78,1	6
VALORS ABSOLUTS				
CD16 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0,10 ± 0,34	0,03	0,00 - 1,6	23
CD16 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,22 ± 0,25	0,17	0,00 - 1,1	24
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,59 ± 1,32	0,23	0,01 - 6,5	24
CD11b <sup>+</sup> /CD2 <sup>+</sup>	0,84 ± 0,45	0,87	0,13 - 1,5	12
CD56 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	0,39 ± 0,47	0,23	0,06 - 1,3	6

Taula 6.D.9

Comparació entre les poblacions limfocitàries ( $\times 10^9/L$ ) dels pacients no tractats i dels controls

	PACIENTS (n=34)	CONTROLS (n=32)	p
CD2	3,9 $\pm$ 3,4 n=31	1,5 $\pm$ 0,5 n=27	<0,001
CD4	2,1 $\pm$ 1,3	0,9 $\pm$ 0,4	<0,001
CD8	1,2 $\pm$ 1,9	0,4 $\pm$ 0,2	0,021
CD16	0,9 $\pm$ 1,4	0,2 $\pm$ 0,1	0,006
CD57	1,3 $\pm$ 2,0	0,2 $\pm$ 0,2	0,003
CD11b	2,0 $\pm$ 2,8	0,4 $\pm$ 0,2	0,002
CD56	0,4 $\pm$ 0,5 n=11	0,2 $\pm$ 0,1 n=15	NS
CD19	29,1 $\pm$ 42,9 n=29	0,2 $\pm$ 0,1 n=27	<0,001



Taula 6.D.10

Comparació entre els quocients limfocitaris entre pacients no tractats i controls

	PACIENTS	CONTROLS	p
CD4/CD8	2,4 ± 1,2 (34)	2,1 ± 0,7 (32)	NS
CD2/CD19	0,6 ± 1,1 (29)	8,6 ± 3,3 (27)	<0,001
CD16/CD2	0,2 ± 0,1 (31)	0,1 ± 0,05 (28)	<0,001
CD16/CD8	0,9 ± 0,7 (34)	0,4 ± 0,2 (32)	<0,001
CD16/CD57	0,9 ± 0,8 (34)	1,0 ± 0,5 (32)	NS
CD16/CD11b	0,5 ± 0,4 (33)	0,4 ± 0,2 (32)	NS
CD16/CD56	1,6 ± 2,4 (9)	0,9 ± 0,4 (15)	NS

Taula 6.D.12

Comparació entre els valors de les poblacions definides per dos determinants antigènics entre pacients no tractats i controls

	PACIENTS	CONTROLS	p
VALORS PERCENTUALS			
CD16 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	9,9 ±10,0 (23)	8,1 ± 6,7 (25)	NS
CD16 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	27,7 ±12,4 (24)	30,0 ±13,3 (24)	NS
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	46,1 ±19,7 (24)	36,0 ±20,4 (24)	0,041
CD11b <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	60,3 ±15,7 (12)	63,7 ±14,4 (32)	NS
CD56 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	57,8 ±14,5 (6)	70,0 ±10,6 (14)	0,048
VALORS ABSOLUTS			
CD16 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0,11 ± 0,34 (23)	0,01 ± 0,02 (24)	NS
CD16 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,22 ± 0,25 (24)	0,06 ± 0,05 (23)	0,004
CD16 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	0,59 ± 1,32 (24)	0,08 ± 0,09 (23)	NS
CD11b <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	0,84 ± 0,45 (12)	0,23 ± 0,10 (18)	<0,001
CD56 <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	0,39 ± 0,47 (6)	0,08 ± 0,07 (15)	0,018

## **RESULTATS DE L'ASSAIG DE CITOTOXICITAT EN PERIODES D'INCUBACIO PROLONGATS**

Les modificacions induïdes en l'ANK per la prolongació de l'assaig de citotoxicitat fins a 20 hores s'han analitzat en un grup de pacients amb LLC-B, un grup de malalts amb hemofilia A i un grup d'individus control. Cada mostra a testar es va col·locar en dues plaques d'assaig diferents que es van incubar la primera durant 4 hores i la segona durant 20 hores.

### **ANK dels individus control en incubacions de 20 hores**

Els valors control s'han obtingut de 12 voluntaris sans, set homes i dues dones. L'edat mitja és de 39,4 anys ( $\pm 12,2$ ) (extrems de 28 a 61). La citotoxicitat exercida, experimental i teòrica, en les diverses proporcions D:E es recullen en la taula 6.E.1. L'ANK teòrica mitja a una proporció D:E 1:200 és de 53% ( $\pm 15,6$ ) amb uns extrems de 29,6% a 78,5%.

A les 20 hores d'incubació s'observa un increment significatiu de la citotoxicitat respecte de la que s'ha exercit a 4 hores, en totes les proporcions D:E (taula 6.E.2).

### **Resultats en pacients amb LLC-B**

S'han inclòs trenta-set malalts amb LLC-B, amb una edat mitja de 64,4 anys ( $\pm 12,7$ ) i uns extrems de 30 a 87 anys. Vint-i-dos eren homes (59,5%) i quinze eren dones (40,5%). La majoria de malalts estaven en estadi 0 o I de la classificació de Rai (40,5% i 43,2%, respectivament) o en estadi A de la classificació de Binet (75,7%).

i LGG ( $0,7 \times 10^9/L \pm 0,6$ ) no difereix significativament dels obtinguts en la sèrie global.

Els valors de citotoxicitat experimental i teòrica obtinguts en l'assaig de 20 hores s'exposen en la taula 6.E.3. L'ANK teòrica mitja de la proporció D:E 1:200 és de 34,2% ( $\pm 16,7$ ) amb uns extrems de 1,1% fins 68,2%. La comparació entre els valors de citotoxicitat a les quatre hores i a vint hores es mostra en la taula 6.E.2. La citotoxicitat a les 20 hores és significativament superior de l'exercida a 4 hores ( $p < 0,001$ ). Malgrat l'increment observat en la citotoxicitat dels pacients, aquesta no arriba als valors d'ANK dels controls en incubacions de 20 hores (taula 6.E.4).

S'ha observat una relació inversa entre l'ANK i la xifra de leucòcits i limfòcits, de forma similar al que succeeix en la sèrie global ( $r$  al voltant de  $-0,5$ ,  $p < 0,001$ ). No s'ha observat correlació amb el nombre de LGG.

No s'ha observat relació entre el valor absolut de les diverses poblacions limfocitàries i l'ANK a 4 o 20 hores, en canvi, sí que existeix una relació directa entre el percentatge de limfòcits CD16<sup>+</sup> ( $r$  al voltant de  $0,5$ ,  $p$  entre  $0,02$  i  $< 0,001$ ) i CD11b<sup>+</sup> ( $r$  al voltant de  $0,4$ ,  $p < 0,04$ ) i l'ANK. La relació directa s'observa tant en els assaigs de 4 hores com en el de 20 hores.

#### **ANK en assaig de 4 i 20 hores en el grup d'hemofílics**

S'han estudiat 12 malalts en assaigs de 4 hores i en cinc d'ells s'han pogut realitzar assaigs de 20 hores d'incubació. Tots els pacients eren de sexe masculí amb una edat mediana de 27,5 anys (extrems de 10 a 68 anys). Set tenien hemofília greu (factor VIII  $< 0,01$  U/L), tres hemofília moderada (factor VIII entre  $0,01$  i  $0,05$  U/L) i dos hemofília lleu (factor VIII  $> 0,5$  U/L). Tots els malalts eren politransfusos i, **excepte un**, estaven infectats pel virus de la immunodeficiència humana.

Els resultats de citotoxicitat teòrica obtinguts als **assaig de 4 i 20** hores d'incubació s'exposen a la taula 6.E.2 i 6.E.4. L'ANK mitja a 4 hores, per una proporció 1:200, és de 14,4 % ( $\pm 16,4$ ) i a 20 hores de 18,8% ( $\pm 17,8$ ). La citotoxicitat exercida pels malalts d'hemofilia és significativament inferior als valors controls tant en assaigs de 4 hores com de 20 hores i, en l'assaig de 20 hores, respecte dels pacients amb LLC-B. A més a més, la citotoxicitat desenvolupada a les 20 hores d'incubació no difereix de l'exercida a 4 hores, en contra del que succeeix en controls i en pacients amb LLC-B (taula 6.E.4).

Taula 6.E.1

Resultats de l'estudi de citotoxicitat en períodes d'incubació de 20 hores en controls (n=12)

Proporció D:E	Mitja $\pm$ D.S.	Mediana	Extrems	n
ANK EXPERIMENTAL (%)				
1:200	52,3 $\pm$ 16,8	52,2	20,2 - 79,9	12
1:100	44,3 $\pm$ 16,9	46,4	22,4 - 64,5	12
1:50	28,5 $\pm$ 15,0	28,5	5,4 - 52,8	12
1:25	18,7 $\pm$ 12,3	18,1	3,5 - 39,0	12
ANK TEORICA (%)				
1:200	53,0 $\pm$ 15,6	51,4	29,6 - 78,5	12
1:100	42,0 $\pm$ 14,6	44,0	21,5 - 59,8	12
1:50	30,1 $\pm$ 15,8	31,4	8,0 - 56,1	12
1:25	19,7 $\pm$ 13,3	20,1	0 - 36,2	12

Taula 6.E.2

Comparació entre valors de citotoxicitat en 4 hores i 20 hores d'incubació obtinguts en controls, hemofílics i pacients amb LLC-B

ACTIVITAT NATURAL KILLER			
	4 hores	20 hores	p
CONTROLS (n=12)			
1:200	33,3 ± 12,7	53,0 ± 15,6	0,003
1:100	23,9 ± 8,9	42,0 ± 21,5	0,013
1:50	16,1 ± 5,9	30,1 ± 15,8	0,009
1:25	10,4 ± 4,2	19,6 ± 13,3	0,032
LLC-B (n=37)			
1:800	30,21 ± 19,1	46,9 ± 20,0	<0,001
1:400	25,0 ± 16,8	41,3 ± 18,0	<0,001
1:200	19,2 ± 14,5	34,2 ± 16,7	<0,001
1:100	13,3 ± 11,1	26,6 ± 16,0	<0,001
1:50	8,9 ± 8,9	19,9 ± 15,0	<0,001
HEMOFILICS (n=5)			
1:200	9,9 ± 8,2	18,8 ± 17,8	NS
1:100	6,7 ± 5,9	15,4 ± 13,7	NS
1:50	4,1 ± 3,5	11,8 ± 9,5	NS

Taula 6.E.3

Resultats de l'estudi de citotoxicitat en incubacions de 20 hores en pacients amb LLC-B

Proporció D:E	Mitja $\pm$ D.S.	Mediana	Extrems	n
ANK EXPERIMENTAL (%)				
1:800	43,5 $\pm$ 19,2	49,0	2,6 - 69,8	31
1:400	42,4 $\pm$ 16,9	48,7	4,3 - 66,6	31
1:200	35,3 $\pm$ 17,2	38,4	0,0 - 73,9	37
1:100	26,7 $\pm$ 16,8	28,1	0,0 - 70,9	36
1:50	19,9 $\pm$ 14,6	18,5	0,0 - 57,8	36
ANK TEORICA (%)				
1:800	46,9 $\pm$ 20,0	50,7	3,7 - 83,5	37
1:400	41,3 $\pm$ 18,0	44,4	3,7 - 78,7	37
1:200	34,2 $\pm$ 16,7	36,4	1,1 - 73,6	37
1:100	26,6 $\pm$ 16,0	26,2	0,0 - 68,2	37
1:50	19,8 $\pm$ 15,0	18,6	0 - 62,7	37
1:25	14,7 $\pm$ 13,8	11,1	0 - 57,1	37



Taula 6.E.4

Comparació entre l'ank de llc i controls en assaigs de 4 hores i 20 hores d'incubació

	ASSAIG DE 4 HORES			ASSAIG DE 20 HORES		
	LLC n=37	p	CONTROLS n=12	LLC n=37	p	CONTROLS n=12
1:200	19,2 ± 14,5	0,004	33,3 ± 12,7	34,2 ± 16,7	0,001	53,0 ± 15,6
1:100	13,3 ± 11,1	0,004	23,9 ± 8,9	26,6 ± 16,0	0,011	42,0 ± 21,5
1:50	8,9 ± 8,9	0,012	16,1 ± 5,9	19,9 ± 15,0	0,049	30,1 ± 15,8
	HEMOFILICS n=12	p	CONTROLS n=12	HEMOFILICS n=5	p	CONTROLS n=12
1:200	14,4 ± 16,4	0,005	33,3 ± 12,7	18,8 ± 17,8	0,001	53,0 ± 15,6
1:100	12,9 ± 15,0	0,014	23,9 ± 8,9	15,4 ± 13,7	0,023	42,0 ± 21,5
1:50	7,2 ± 9,6	0,004	16,1 ± 5,9	11,8 ± 9,5	0,030	30,1 ± 15,8
	LLC n=37	p	HEMOFILICS n=12	LLC n=37	p	HEMOFILICS n=5
1:200	19,2 ± 14,5	NS	14,4 ± 16,4	34,2 ± 16,7	0,056	18,8 ± 17,8
1:100	13,1 ± 11,1	NS	12,9 ± 15,0	26,6 ± 16,0	NS	15,4 ± 13,7
1:50	8,9 ± 8,9	NS	7,2 ± 9,6	19,9 ± 15,0	NS	11,8 ± 9,5

## EVOLUCIO DE L'ACTIVITAT NATURAL KILLER I LES POBLACIONS LIMFOCITARIES AMB EL TRANCURS DEL TEMPS. MODIFICACIONS SECUNDARIES AL TRACTAMENT.

En aquest apartat s'exposen els resultats seqüencials de citotoxicitat i de les poblacions limfocitàries en un grup de vint-i-sis pacients i les modificacions induïdes en ella pel transcurs del temps o per efecte de la medicació anti-leucèmica. Els resultats de citotoxicitat es comparen amb els resultats obtinguts la primera vegada que els pacients es van incloure a l'estudi. Aquests vint-i-set malalts es divideixen en tres grups: un primer grup que no reb tractament al llarg de l'estudi, un segon grup que sempre està sota tractament alquilant o que l'inicia un cop inclòs a l'estudi, i un tercer grup constituït per malalts inclosos en un protocol terapèutic seqüencial de clorambucil i  $\alpha$ -interferó.

### A. EVOLUCIO DE L'ACTIVITAT NATURAL KILLER I LES POBLACIONS LIMFOCITARIES EN ELS PACIENTS NO SOTMESOS A TRACTAMENT.

Aquest grup el componen un total de vuit malalts amb una edat mediana de 67 anys (extrems 52 a 80), la meitat són homes i l'altra dones. Sis malalts estan en estadi 0 de Rai (75%) i dos en estadi I (25%). Tots els pacients excepte un estan en estadi A de Binet (87,5%). El temps transcorregut entre la primera determinació de l'ANK i la següent té una mediana de 2,65 mesos (extrems 0,1 i 4,93). Cap pacient va canviar d'estadi en el transcurs de temps entre les determinacions d'ANK.

La xifra mitja de limfòcits en el primer estudi és de  $52,7 \times 10^9/L \pm 45,3$  sense observar-se modificacions significatives quan es van realitzar els estudis posteriors ( $52,69 \times 10^9/L \pm 45,3$  vs  $61,3 \times 10^9/L \pm 67,9$ ). Tampoc es van observar variacions en la xifra de LGG.

En tres malalts no s'observen modificacions en l'activitat natural killer en el transcurs del temps. En quatre pacients augmenta i en un pacient disminueix. En dos dels pacients en els que la citotoxicitat augmenta l'increment és molt notable, passant de valors basals a una proporció 1:200 de 5,74% i 3,0% a 36,37% i 26,59% respectivament. En un dels malalts la primera determinació coincideix amb un episodi infecció greu. Les modificacions en l'ANK estan recollides a la gràfica 6.F.1.1.

Les variacions en les poblacions limfocitàries es poden analitzar en sis malalts. No s'observen variacions a nivell global tant en el percentual de cadascuna de les poblacions com en la seva xifra absoluta. En cinc pacients es mantenen estables i en un s'assisteix a un increment percentual de la població CD2<sup>+</sup> i NK (CD16<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup> i CD11b<sup>+</sup>). Aquest últim pacient mostra un increment de l'activitat *natural killer* entre les dues determinacions (proporció 1:200 de 38,36% a 50,89%). Quan s'analitzen les poblacions de forma absoluta la situació es similar que en l'anàlisi percentual on únicament un pacient augmenta la xifra de limfòcits CD16<sup>+</sup> de  $0,47 \times 10^9/L$  fins a  $1,89 \times 10^9/L$  i de forma similar incrementa el nombre de limfòcits CD57<sup>+</sup> i CD11b<sup>+</sup>.

#### B. EVOLUCIO DE L'ACTIVITAT NATURAL KILLER I LES POBLACIONS LIMFOCITÀRIES EN ELS PACIENTS SOTMESOS A TRACTAMENT.

Nou dels pacients estudiat de forma seqüencial estan sotmesos a tractament al llarg de l'estudi. L'edat mediana és de 67 (extrems 52 a 83 anys), sis són homes i tres dona. Quatre malalts estan en estadi 0 de Rai (44,4%), quatre en estadi II (44,4%) i un en estadi IV (1,1%). Si es classifiquen d'acord amb el sistema de Binet, sis pacients estan en estadi A (66,6%), dos en estadi B (22,2%) i un en estadi C (11,1%). El tractament que rebien era CLB o CLB+PDN en set casos, poliquimioteràpia amb ciclofosfamida, melfalan i PDN en un cas, i CLB seguit de PDN i ciclosporina A en el darrer malalt.

El temps transcorregut entre la primera i les següents determinacions és de 5,24 mesos (1,28 i 12,85). Vuit pacients es van mantenir en l'estadi en el que van entrar dintre de l'estudi i un va progressar a un estadi superior (de AI a BII). La determinació es va repetir entre 2 i 4 vegades.

La xifra mitja de limfòcits inicial és de  $28,9 \times 10^9/L$  ( $\pm 23,2$ ) amb una reducció que no assoleix significació estadística al llarg de l'estudi ( $20,0 \times 10^9/L \pm 20,7$ ).

L'evolució de l'ANK, de la xifra de limfòcits i de seves poblacions d'aquests vuit pacients s'exposa a continuació:

- i) En dos malalts: l'ANK és baixa i es manté estable. La xifra de limfòcits es manté superior a  $50 \times 10^9/L$  en el transcurs del seguiment seqüencial.
  
- ii) En tres malalts: la citotoxicitat augmenta en el transcurs del tractament. El primer pacient no redueix de forma important la xifra de limfòcits ( $1,6 \times 10^9/L$  a  $1,4 \times 10^9/L$ ), però sí que incrementa de forma percentual i absoluta la xifra de limfòcits CD16<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup> i CD11b<sup>+</sup>. En els altres dos pacients l'augment en l'ANK coincideix amb una reducció de la xifra de limfòcits (de  $9,5 \times 10^9/L$  a  $6,6 \times 10^9/L$  i de  $8,1 \times 10^9/L$  a  $5,1 \times 10^9/L$ , respectivament). Només es disposa de la determinació de poblacions limfocitàries de l'últim assaig de citotoxicitat en un d'aquests malalts, on s'observa un percentatge de limfòcits NK elevat (CD16<sup>+</sup> 6,7%, CD57<sup>+</sup> 18%, CD11b<sup>+</sup> 21%). En un dels malalts s'assisteix, en una determinació posterior, al retorn als valors basals de citotoxicitat coincidint amb una elevació de la xifra de limfòcits al doble dels valors inicials ( $18,4 \times 10^9/L$ ).

iii) En tres malalts: la citotoxicitat disminueix en el transcurs de tractament. En el primer cas es produeix una disminució moderada en la xifra de limfòcits (de  $33,5 \times 10^9/L$  a  $25,4 \times 10^9/L$ ) sense que es disposi de les poblacions limfocitàries. En el segon malalt disminueixen transitòriament els valors de citotoxicitat per retornar als valors basals als tres de tractament. Els limfòcits baixen inicialment de  $22,9 \times 10^9/L$  a  $6,3 \times 10^9/L$  i es mantenen estables quan s'observa el retorn de l'ANK als nivells basals. En aquest pacient no s'observa un canvi percentual en les poblacions limfocitàries amb antígens NK. Del tercer malalt d'aquest grup es disposa de quatre determinacions d'ANK en el transcurs de 13 mesos. Inicialment s'assiteix a una disminució en la citotoxicitat que s'acompanya d'un increment en la xifra de limfòcits (de  $29,9 \times 10^9/L$  a  $41,8 \times 10^9/L$ ) amb uns valors percentuals de població NK quasi indetectables. Posteriorment, i coincidint amb una disminució dels limfòcits totals, incrementa l'ANK. L'increment en l'activitat NK s'acompanya de l'augment percentual en les poblacions NK (figura 6.F.2.1).

iv) En un malalt: es disposa de determinacions de citotoxicitat durant un període de vuit mesos en el que rep tractament amb CLB i suspen el fàrmac. L'ANK es manté estable mentres rep CLB dintre d'uns valors normals (40,9% i 34,2%). Al suspendre el tractament no s'observa cap canvi en l'ANK malgrat que la xifra de limfòcits s'incrementa lleugerament (de  $4,7 \times 10^9/L$  a  $8,1 \times 10^9/L$ ). Després de suspendre el tractament s'objectiva un increment percentual en els limfòcits NK (CD16<sup>+</sup> de 2% a 9%, CD57<sup>+</sup> de 6% a 13%, CD11b<sup>+</sup> de 10% a 19%).

### C. EVOLUCIO DE L'ACTIVITAT NATURAL KILLER I LES POBLACIONS LIMFOCITARIES EN ELS PACIENTS SOTMESOS A TRACTAMENT SEQUENCIAL AMB CLORAMBUCIL I $\alpha$ -INTERFERO.

Aquest grup està constituït per nou malalts estudiats i controls de forma similar, i per tant, formen un grup homogeni per l'anàlisi.

Els malalts inclosos tenen una mediana d'edat de 60 anys (extrems 30-83 anys). Cinc dels pacients eren homes i quatre dones. Tots estaven en estadi A de la classificació de Binet. A l'inici de l'estudi dos pacients estaven en estadi 0 de Rai, sis en estadi I i un en estadi II. L'estratègia del protocol terapèutic està descrita a l'apartat de material i mètodes i consisteix en disminuir inicialment la massa tumoral mitjançant un agent alquilant (CLB) i després assajar l'efecte anti-tumoral d'un immunomodulador ( $\alpha$ -IFN).

Els nou malalts inclosos són pacients que no han rebut tractament prèviament i en els que s'avalua clínicament i analíticament (incloent-hi l'estudi de citotoxicitat) al llarg del protocol. Un cop finalitzat el tractament es repeteix l'avaluació.

Per aconseguir la reducció de limfòcits fins el nivell exigít es va requerir una mediana de 4 tandes de CLB (extrems 4-12). La mediana de mesos d'administració d'interferó és de 6 mesos (extrems 4-12).

Les principals característiques clíniques i analítiques es recullen a la taula 6.F.3.1. Al finalitzar l'estudi el nombre de pacients en estadi 0 de Rai era de vuit. El CLB va provocar la disminució de la xifra de limfòcits i que es va mantenir durant el tractament amb Interferó. La xifra de neutròfils, hemoglobina i plaquetes es va reduir per efecte del tractament, sense que la seva reducció tingués significació clínicament.

Quan s'analitza de forma global l'evolució de l'ANK en aquest grup de pacients s'observa que l'ANK basal dels malalts era, a una proporció 1:200, de  $21,4\% \pm 11,5$ . La citotoxicitat global basal és baixa, però el 44,4% dels malalts tenen una citotoxicitat normal. Després de la reducció de limfòcits aconseguida pel CLB la citotoxicitat es va mantenir en uns nivells similars ( $21,7\% \pm 7,1$ ). No obstant, el 75% dels pacients amb ANK basal baixa la normalitza després del CLB i el 50% dels que la tenen normal la disminueixen malgrat el descens en el nombre de limfòcits. Després del tractament amb  $\alpha$ -IFN la citotoxicitat efectuada pels pacients es va normalitzar ( $44,3\% \pm 19,1$ ). Només un malalt manté una citotoxicitat inferior al normal. La gràfica 6.F.3.1 recull l'evolució de la citotoxicitat d'aquest grup de pacients. Si s'analitza de forma individualitzada el comportament de l'ANK (figura 6.F.3.2) observem que cinc pacients incrementen la seva citotoxicitat al llarg de l'estudi, en dos la citotoxicitat es manté estable, en un l'ANK augmenta després de l'administració del CLB si bé no es manté amb IFN i, finalment, en un pacient disminueix després del CLB sense disposar-se de la determinació després de l'IFN.

L'evolució de les poblacions limfocitàries s'exposa a la gràfica 6.F.3.3 i 6.F.3.4. De forma percentual s'observa un increment en la població T i NK i un decrement de la població limfoide B. En valors absoluts s'observa una reducció de totes les poblacions limfocitàries analitzades després del tractament amb CLB que retornen als nivells basals després de l'administració d' $\alpha$ -IFN. La població CD19<sup>+</sup> mostra un descens continuat al llarg de l'estudi sense obtenir-se diferències significatives entre la xifra de limfòcits CD19<sup>+</sup> post-CLR i post- $\alpha$ IFN.

Taula 6.F.3.1

Descripció de les principals característiques dels pacients inclosos en un protocol de tractament seqüencial amb CLB i  $\alpha$ -IFN.

	Basal	Post-CLB	Post-IFN	
Rai [0/I/II] (n)	2/6/1	3/5/1	8/1/0	**
Limfòcits ( $\times 10^9/L$ )	22,4 $\pm$ 4,5	7,2 $\pm$ 3,2	7,0 $\pm$ 4,1	*
Neutròfils ( $\times 10^9/L$ )	4,7 $\pm$ 1,8	3,3 $\pm$ 1,0	3,3 $\pm$ 1,1	*
Hemoglobina (g/L)	153,1 $\pm$ 9,4	144,8 $\pm$ 9,3	148,0 $\pm$ 8,6	*
Plaquetes ( $\times 10^9/L$ )	188,9 $\pm$ 50,4	177,9 $\pm$ 47,4	162,1 $\pm$ 32,6	*

\* p significativa entre els valors basals i els post-CLB i post-IFN.  
 \*\* p significativa entre els valors post-IFN i els basals i post-CLB.



Figura 6.F.1.1

Evolució de l'ANK en els pacients amb LLC-B no tractats

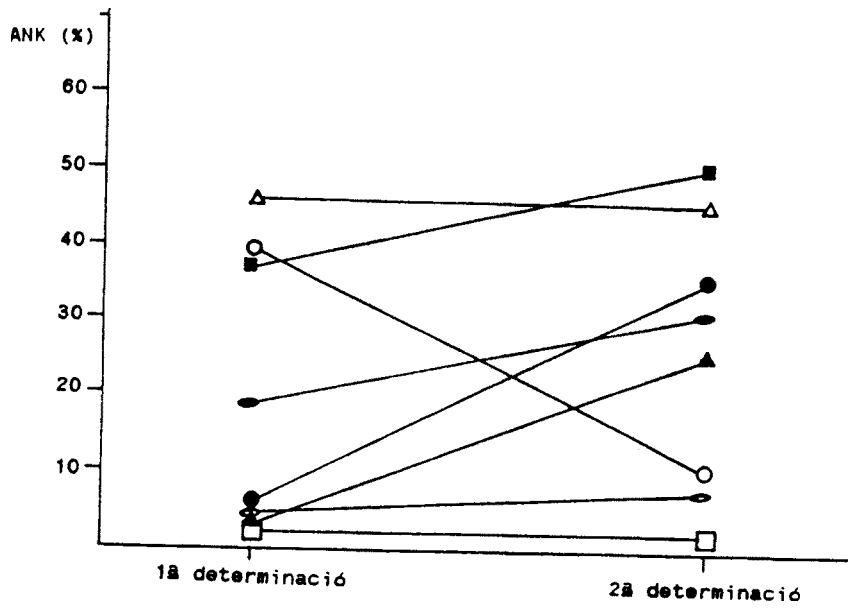


Figura 6.F.2.1

Evolució de l'ANK, la xifra de limfòcits totals i de les poblacions limfoides en un pacient sota tractament amb CLB

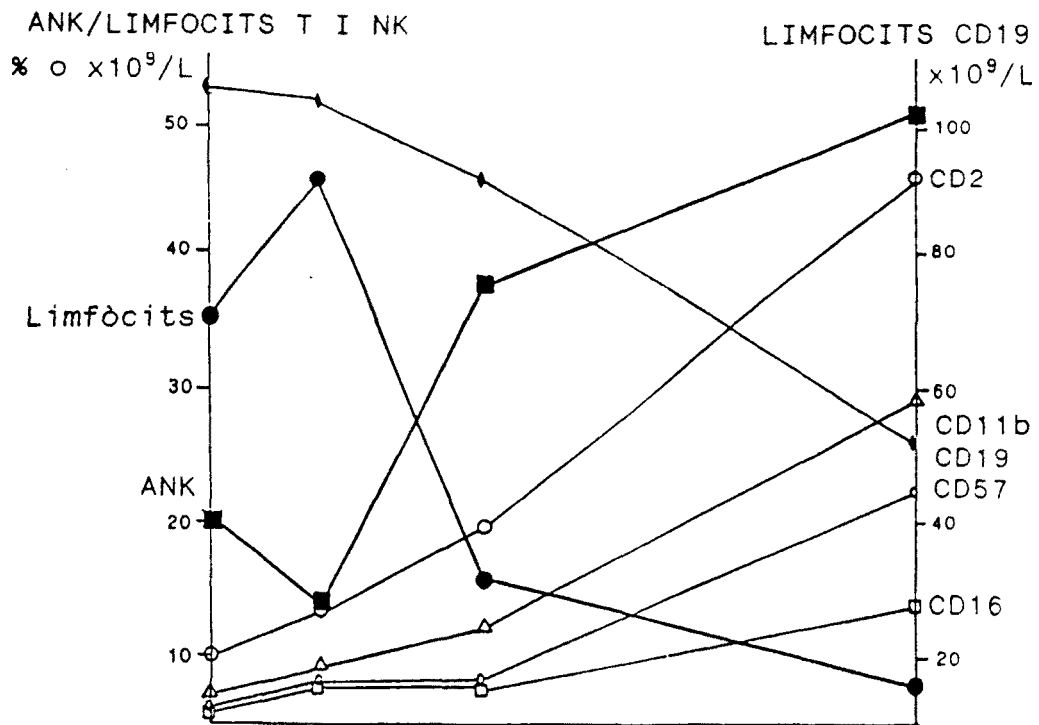


Figura 6.F.3.1

Evolució de les xifres mitges de citotoxicitat, limfòcits totals i poblacions en els períodes basal (B), post-CLB (CLB) i post- $\alpha$ -IFN (IFN).

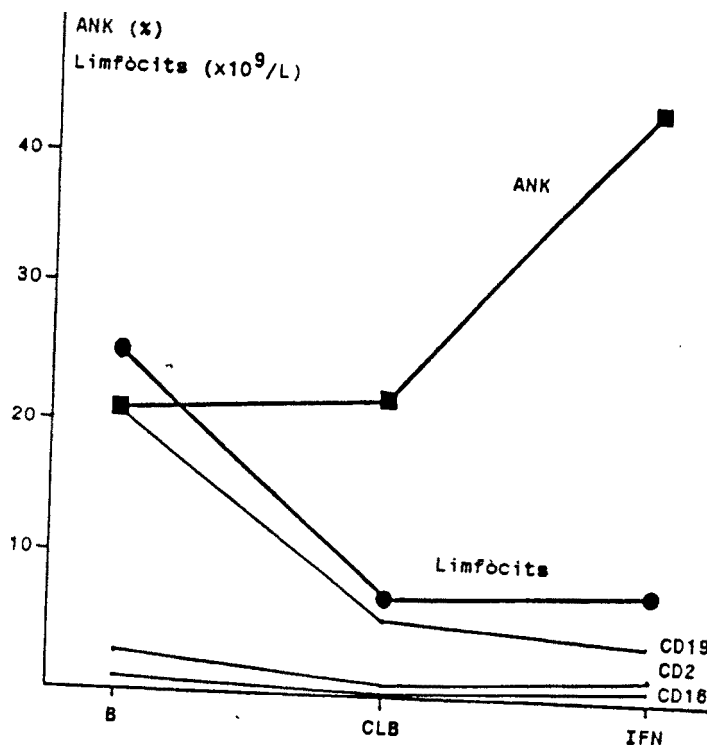
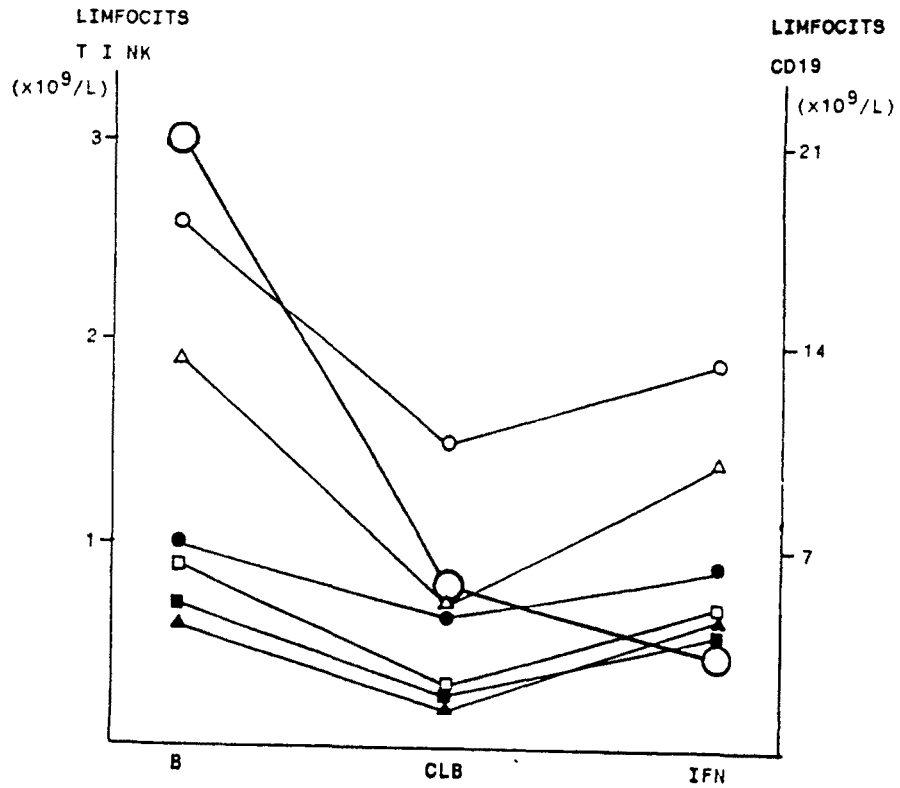


Figura 6.F.3.4

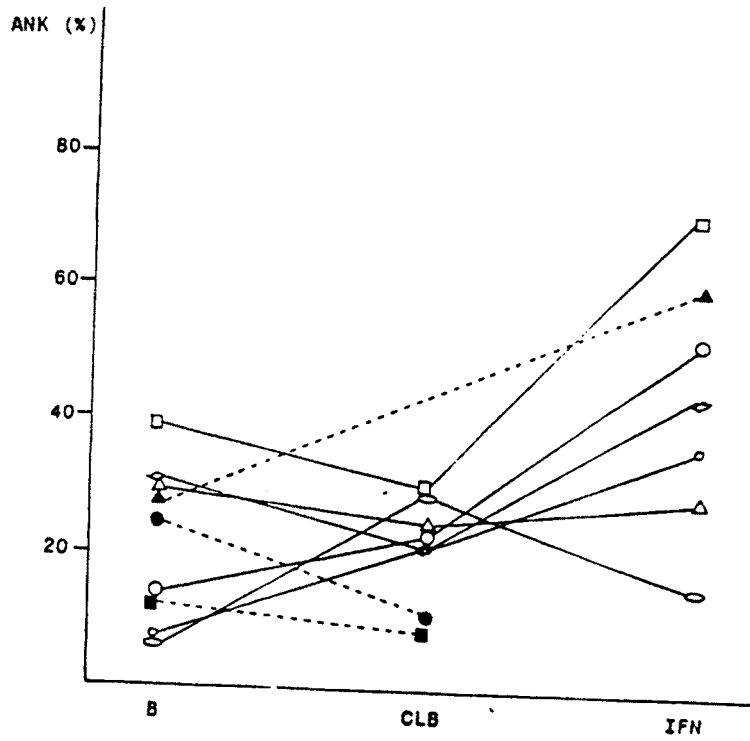
Canvis en els valors migs de les poblacions limfocitàries al llarg de protocol de CLB-IFN



*B = basal*  
*CLB = post-clorambucil*  
*IFN = post-interferó*

Figura 6.F.3.2

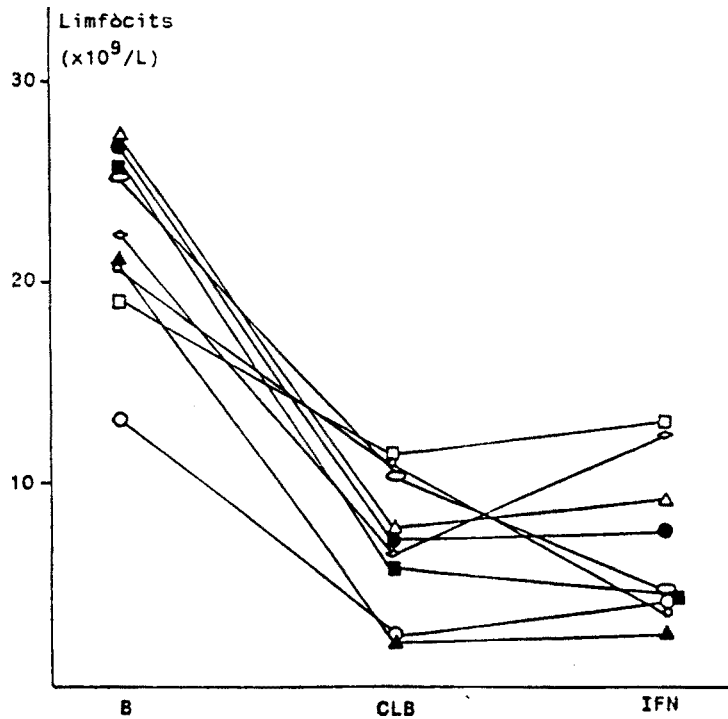
Canvis en la citotoxicitat exercida per cada malalt, representats per un símbol diferent, al llarg del protocol terapèutic CLB-IFN



B = basal  
 CLB = post-clorambucil  
 IFN = post-interferó

Figura 6.F.3.3

Evolució dels limfòcits totals de cada malalt, cadascun representat per un símbol diferent, al llarg del protocol terapèutic CLB-IFN



*B = basal*  
*CLB = post-clorambucil*  
*IFN = post-interferó*