



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN LÍNEAS CELULARES
DE LINFOMA NO-HODGKIN RESISTENTES A
RITUXIMAB (anti-CD20) MEDIANTE LA PROTEÍNA
QUIMÉRICA anti-CD20-hIFN α ”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

ELSA ANDREA GARCÍA OLIN



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: RODOLFO PASTELIN PALACIOS

VOCAL: ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES

SECRETARIO: MARIO I. VEGA PAREDES

1er. SUPLENTE: PERLA DEYANIRA JIMÉNEZ

2° SUPLENTE: ARACELI MENDIETA RERGIS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN LABORATORIO DE SEÑALIZACIÓN MOLECULAR
EN CÁNCER. UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS.
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI. HOSPITAL DE ONCOLOGÍA.**

MARIO I. VEGA PAREDES
ASESOR

ELSA ANDREA GARCÍA OLIN
SUSTENTANTE

DEDICATORIAS

A mi mamá:

Por creer en mí y enseñarme valor e independencia, por darme siempre lo mejor de ti, incluso en los momentos más difíciles para ambas. Porque sé que la persona en quien me he convertido es gracias a ti. Juntas iniciamos este sueño y juntas lo terminamos.

A mi papá:

Por querer siempre lo mejor para mí y apoyarme desde el inicio de este viaje a pesar de que el camino no siempre fue fácil. Gracias por la orientación y por enseñarme que la fuerza de voluntad hace milagros.

A la luz de mi vida:

Por estar conmigo a cada paso del camino y darme la fuerza para seguir. Este es un logro tuyo y mío, lo comparto contigo al igual que comparto mi vida entera. Gracias por tu amor infinito, por tu comprensión y por no dejarme caer. Sabes que no me alcanzan las palabras... Te amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario I. Vega: por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por la orientación que me dio para hacer posible éste trabajo, por la confianza que me brindó y por todo su apoyo.

A los miembros de mi jurado: Dr. Rodolfo Pastelin Palacios y Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares, gracias por sus aportaciones para mejorar éste trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de señalización: Alma, Yuri, Alberto, Gabo y Gerardo por brindarme su amistad, por el tiempo compartido y por tantos momentos divertidos.

A mis amigos:

Chío y Monse, por todo el ánimo que me dieron, por alegrar mis días con sus risas, por los excepcionales momentos compartidos a lo largo de la carrera y por su amistad incondicional.

Rocío y Karen, por todo el tiempo que vivimos juntas, por las divertidas noches de desvelo y por todo su apoyo a través de estos años. Más que una amiga y una prima, son como mis hermanas.

Andrés, porque no dudaste ni un solo momento que éste día llegaría, por estar siempre para mí y por todas tus palabras de aliento.

ABREVIATURAS

2F7R: 2F7 resistente a rituximab

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

AP-1: proteína activadora 1

APO2L/ TRAIL: ligando APO2/ Ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2

Bcl-2: Proteína 2 de linfoma de linfocitos B

Bcl-6: Proteína 6 de linfoma de linfocitos B

Bcl-xL: Proteína extra grande de linfoma de linfocitos B

BCR: Receptor de linfocitos B

CDC: Citotoxicidad dependiente de complemento

CDDP: cis-diaminodicloroplatino(II)

CHOP: Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristine, prednisona

CLL: Leucemia linfocítica crónica

DLBCL: Linfoma difuso de células B grandes

DMSO: Dimetilsulfóxido

DR5: Receptor de muerte 5

EBV: Virus de Epstein Barr

ERK: cinasa extracelular

FDA: Agencia de alimentos y medicamentos

HBSS: Solución salina tamponada de Hanks

HCV: Virus de hepatitis C

HHV8: Virus herpes humano 8

hIFN α : interferón alfa humano

HLTV-1: Virus linfotrópico humano tipo 1

HRP: Peroxidasa de rábano

IFN α : Interferón alfa

IFNAR: Receptor de interferones tipo 1

IKK: Cinasa I κ B

INEGI: Instituto nacional de estadística, geografía e informática

IRF: Factor regulador de interferón

ISG: genes estimulados por interferón

ISGF3: factor génico 3 estimulado por interferón

ISRE: elemento de respuesta estimulado por interferón

JAK1: Cinasa Janus 1

JNK: cinasa c-Jun NH₂-terminal

LNH: Linfoma no Hodgkin

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno

MCL: Linfoma de células del manto

MDA5: Proteína 5 asociada a la diferenciación de melanoma

NF- κ B: factor nuclear κ B

NP-40: octil fenoxipolietoxiletanol

OMS: Organización mundial de la salud

PBS: Buffer de fosfatos

PI3K: fosfatidilinositol 3-cinasa

PIP₂: fosfatiditlinositol bifosfato

IP₃: inositol trifosfato

PKC: Proteína cinasa C

PLC γ : Fosfolipasa C gamma

PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

R-CHOP: Rituximab-ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona

RIG-1: Gen 1 inducible por ácido retinoico

RIPA (buffer): Ensayo de radioinmunoprecipitación

RKIP: proteína inhibidora de Raf cinasa

SDS: Dodecilsulfato sódico

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SOCS: proteínas supresoras de señalización por citocinas

SP-1: proteína de especificidad 1

STAT: Transductores de señal y activadores de la transcripción

TGF β : factor de crecimiento transformante beta

TLR: Receptor tipo toll

Tyk2: Tirosina cinasa 2

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

XAF-1: Factor 1 asociado a XIAP

XIAP: Proteína inhibidora de apoptosis ligada a X

XTT: 3'-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolio]-bis-(4-metoxi-6-nitro) bencensulfonato]

RamosR: Ramos resistentes a rituximab

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
1. Epidemiología.....	11
2. Linfoma.....	13
3. Fisiopatología de Linfoma no-Hodgkin.....	13
4. Tratamiento.....	17
5. CD20 y su vía de señalización.....	21
6. Interferones tipo 1 y su vía de señalización.....	26
7. IFN tipo 1 en cáncer.....	30
8. Proteína de fusión (anti-CD20-hIFN α).....	35
JUSTIFICACIÓN.....	37
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
HIPÓTESIS.....	38
OBJETIVOS.....	38
Objetivo General.....	38
Objetivos específicos.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
Líneas celulares y reactivos.....	39
Ensayos de viabilidad.....	39
Ensayos de apoptosis.....	40
Electroforesis.....	42
Western Blot.....	42
RESULTADOS.....	43
La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α inhibe la proliferación de las líneas celulares de LNH resistentes a rituximab.....	43

La proteína de fusión anti-CD20-hIFNα inhibe la viabilidad celular en líneas celulares de LNH resistentes a rituximab.....	44
El tratamiento de líneas celulares de LNH resistentes a rituximab con la proteína de fusión anti-CD20-hIFNα induce apoptosis.....	47
La proteína de fusión anti-CD20-hIFNα induce quimiosensibilidad en líneas celulares de LNH resistentes a rituximab.....	47
El efecto de quimiosensibilidad en líneas celulares de LNH resistentes a rituximab de la proteína de fusión anti-CD20-hIFNα es independiente del tiempo de tratamiento.....	51
La proteína de fusión anti-CD20-hIFNα es capaz de inhibir la señalización de CD20 mediante la vía de NF-κB y la señalización de IFNAR mediante la vía de PKCδ en líneas celulares de LNH resistentes a rituximab.....	53
DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES.....	58
PERSPECTIVAS.....	58
REFERENCIAS.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Inducción de apoptosis mediante el entrecruzamiento de CD20 con rituximab.....	23
Figura 2. Cascada de señalización inducida por rituximab en líneas celulares de LNH.....	25
Figura 3. IFN α posee una actividad pleiotrópica y antagónica entre células del sistema inmune y en células tumorales	27
Figura 4. Señalización inducida por IFN α	29
Figura 5. Señalización inducida por IFN α en líneas celulares de LNH.....	34
Figura 6. Producción de la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α	35
Figura 7. La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α inhibe la proliferación de líneas celulares de LNH.....	45
Figura 8. La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α disminuye la viabilidad de la línea celular RamosR.....	46
Figura 9. La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α induce apoptosis en la línea celular 2F7R.....	49
Figura 10. La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α quimiosensibiliza a las líneas celulares resistentes a rituximab.....	50
Figura 11. La quimiosensibilización mediada por la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α no es dependiente del tiempo.....	52
Figura 12. La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α inhibe la expresión de NF- κ B y de la vía de PKC δ y STAT1.....	55

INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología

El cáncer es uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial, ya que en 2008, de acuerdo a cifras reportadas por la base de datos de “Globocan”, más de siete millones de personas en el mundo fallecieron a causa de esta enfermedad, lo cual representa el 13.3 por ciento de las defunciones de ese año ^{1,2}.

En México, de acuerdo con datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), el cáncer es la tercera causa de muerte por enfermedad ya que en 2011 fallecieron 71 350 personas víctimas de neoplasias malignas, lo que representa el 13.8% del total (incluyendo niños) de las defunciones por enfermedad registradas en ese año. Las neoplasias hematológicas son la segunda causa de muerte entre las neoplasias malignas, en 2011 fallecieron 7 291 personas (incluyendo niños), lo que corresponde a 10.22% (leucemia 5.68%, linfoma no-Hodgkin 3.27%, mieloma múltiple 1.27%) del total de muertes debidas a neoplasias malignas excluyendo melanoma. La distribución porcentual de las muertes registradas muestra que en 2011 el 3.41% y 2.73% de los decesos por tumores malignos en los sexos masculino y femenino, respectivamente, fueron a causa de linfoma no-Hodgkin (LNH)³.

En el año 2008, la incidencia de linfoma en México fue de 5 333 personas. Estos datos incluyen aproximadamente 4 276 casos nuevos de LNH (2 395 hombres y 1 891 mujeres). Se calcula que en el 2020 alrededor de 5 785 personas (un incremento cerca del 30%) serán diagnosticados con LNH en México¹. Estas cifras incluyen tanto a niños como a adultos.

En nuestro país, la incidencia por edad es de 2.6/100 000 para hombres y de 1.6/100 000 para mujeres, ambos de entre 15 y 39 años. Para edades entre 60-64 años, son de 12.5/100 000 para hombres y de 11.2/100 000 para mujeres. La incidencia en menores de 14 años es de 1.3/100 000.¹ El LNH es más frecuente

entre hombres que entre mujeres. Por otro lado, la prevalencia de LNH en México a 1,3 y 5 años es de 2.7/100 000; 6.9/100 000 y 10.4/100 000, respectivamente.¹

En Estados Unidos de América, el cáncer es la segunda causa de muerte ⁴ y el LNH es el sexto cáncer más común ^{4,5}. La Sociedad Americana de Cáncer calcula que alrededor de 70 130 casos nuevos de LNH se presentarán en el 2012 y que 18 940 personas (10 320 hombres y 8 620 mujeres) morirán a causa de este cáncer en el mismo año. A partir de 1998 las muertes por LNH comenzaron a disminuir en ambos sexos, y en el periodo 2004- 2008 disminuyó un 2.8% por año en hombres y un 3.2% por año en mujeres. Las estadísticas de supervivencia varían ampliamente según el tipo de célula y la etapa de la enfermedad al momento del diagnóstico. No obstante, la supervivencia relativa general a 1, 5 y 10 años después del diagnóstico para las personas con LNH es de 81%, 67% y 55%, respectivamente ⁴.

El riesgo de desarrollar LNH aumenta con la edad en la mayoría de las poblaciones. Entre los principales factores de riesgo para LNH se encuentran la inmunodeficiencia primaria y adquirida, y agentes infecciosos tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de Epstein Barr (EBV), el virus linfotrópico humano I de células T (HTLV-1), virus del herpes humano 8 (HHV8) y *Helicobacter pylori*⁶.

Se ha reportado que entre familiares de primer grado el riesgo de adquirir linfoma se encuentra en un orden de 1.5-4; sin embargo el riesgo parece mayor para hermanos del mismo sexo, lo cual sugiere factores ambientales compartidos más que factores genéticos. La predisposición genética en el desarrollo de linfomas no es muy común pero incluye ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich e hipogamaglobulinemia ⁷⁻⁹. Aproximadamente el 25% de los pacientes con inmunodeficiencias primarias poco comunes desarrollan linfoma. La exposición a pesticidas ha sido asociada al riesgo de desarrollar LNH, pero no hay datos contundentes excepto tal vez para fenoxiheroicidas y clorofenoles. Este efecto tal vez sea debido a la contaminación con dioxina. Se han investigado también solventes orgánicos sin obtener resultados concluyentes ¹⁰.

2. Linfoma

Los linfomas son trastornos linfoproliferativos malignos en los que las células neoplásicas se encuentran predominantemente en el sistema linforreticular ¹¹. Generalmente se originan en los ganglios linfáticos pero a veces pueden tener un origen extraganglionar, por ejemplo en tubo digestivo, pulmón, piel, bazo o donde quiera que se encuentre tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) ¹¹.

Existen dos tipos de linfoma: los linfomas no-Hodgkin y los linfomas de Hodgkin, que en promedio constituyen el 85% y el 15% de todos los casos nuevos de linfoma, respectivamente ¹². Ambos se comportan, propagan y responden al tratamiento de manera diferente.

En el linfoma de Hodgkin el parénquima tumoral está constituido por la célula de Reed-Sternberg clásica y sus cuatro variantes (simples, multinucleadas, lacunares y linfocíticas-histiocíticas). Con base en la histopatología de los ganglios linfáticos afectados, se reconocen cuatro variantes del linfoma de Hodgkin: de predominio linfocítico, esclerosis nodular, de celularidad mixta y depleción linfocítica ¹².

En los LNH el tejido tumoral está constituido casi exclusivamente por células neoplásicas y el estroma es muy escaso. En cambio, en la enfermedad de Hodgkin suele haber predominio del estroma y las células neoplásicas no siempre son muy abundantes. En general, en cada LNH hay un solo tipo de célula tumoral, la cual corresponde a alguna etapa de diferenciación de las células linfoides. Todas las neoplasias linforreticulares sólidas diferentes del linfoma de Hodgkin son LNH.

3. Fisiopatología de Linfoma no-Hodgkin

Los LNH son un grupo heterogéneo de malignidades del sistema linforreticular que tienen una amplia gama de agresividad. De manera general, pueden agruparse morfológicamente en aquellos que tienen células pequeñas, intermedias o grandes con patrones de crecimiento difuso o nodular y funcionalmente en trastornos de células B o T. La mayoría de los linfomas se incluyen en el fenotipo B (85%), de los cuales aproximadamente el 35% comprende a linfomas foliculares, 30% a linfomas

difusos de células B grandes (DLBCL), 5% a los linfomas del Manto y leucemias linfocíticas crónicas (CLL)/ linfomas linfocíticos pequeños, 2-4% a los de tipo MALT y Waldenstrom y el 10% al resto de los subtipos ¹².

Los LNH pueden clasificarse como indolentes (40%) o agresivos (60%). Los indolentes son CLL de células B/ linfoma linfocítico pequeño, linfoma de la zona marginal, linfoma linfoplasmacitoide y linfoma de centro folicular. Por otro lado, los agresivos son el DLBCL, el linfoma de células del manto, el tipo Burkitt y leucemia de células B precursoras ¹³.

La presencia de marcadores de superficie y/o intracelulares de los linfocitos es de gran utilidad en la clasificación de los linfomas. Actualmente se utiliza la clasificación propuesta por la organización mundial de la salud (OMS) en 2008 y está basada en información citológica, molecular e inmunológica. Esta clasificación incluye todos los tipos de linfoma descritos más recientemente y usa términos distintos para los linfomas de células del centro folicular ¹¹.

Las causas de LNH no se conocen totalmente pero hay indicios que sugieren su asociación con agentes infecciosos, por ejemplo el aumento de la incidencia en personas infectadas VIH. El papel de los agentes infecciosos, la estrategia para evadir la vigilancia del sistema inmune, la identificación de oncogenes, de genes supresores y las modificaciones de los mecanismos de regulación del ciclo celular son los acontecimientos científicos importantes de los últimos años que ayudan a conocer y a comprender mejor los mecanismos de la “linfomagénesis” ¹⁴.

Los estudios citogenéticos y los avances en genética molecular permiten reconocer factores etiológicos, mecanismos fisiopatológicos y realizar el diagnóstico clínico de la enfermedad. En algunos casos también ayudan al pronóstico.

Los LNH se han estudiado ampliamente mediante el uso de citogenética y se ha determinado que 75% de los casos de linfoma Burkitt presentan la translocación $t(8;14)(q24;q32)$ y el 10-15% presentan las variantes $t(2;8)(p12;q24)$ y $t(8;22)(q24;q11)$. Todas estas translocaciones afectan la regulación del

proto-oncogén *MYC*, el cual se encuentra en el sitio 8q24, debido a que se fusiona con las secuencias promotoras de los genes para la cadena pesada de inmunoglobulina ubicada en el sitio 14q32, para la cadena ligera κ ubicada en el sitio 2p12 y para la cadena ligera λ ubicada en el sitio 22q11, respectivamente, resultando en la expresión constitutiva del oncogén. Las translocaciones que contienen los linfomas de células B involucran a genes de inmunoglobulina y a un proto-oncogén ¹³. Otros proto-oncogenes involucrados en la patogénesis de los linfomas de células B, son *BCL1* en el cromosoma 11 (su producto, la ciclina D, regula la mitosis) relacionado con linfoma de células del manto, *BCL2* en el cromosoma 18 (regula la apoptosis) relacionado con linfomas foliculares y linfomas difusos de células grandes, *BCL3* en el cromosoma 19 (inhibe la transcripción de NF- κ B), *BCL6* en el cromosoma 3 (regula la proliferación celular y la diferenciación) y *PAX5* en el cromosoma 9 (su producto, el factor de transcripción BSAP, participa en el desarrollo de los linfocitos B).

El 85% de los LNH tienen anormalidades citogenéticas, por lo tanto, los defectos cromosomales clonales son obligatorios en la linfomagénesis. Algunos ejemplos de estas translocaciones en los linfocitos B son la $t(14;18)(q32;q21.3)$ ¹⁵ en el 70-95% de los linfomas foliculares y en el 20-30% de los linfomas difusos de células grandes, la $t(9;14)(p13;q32)$ ¹⁶ en los linfomas linfoplasmacitoides y la $t(11;14)(q13;q32)$ en los linfomas del manto ¹⁷.

Las mutaciones del gen supresor tumoral *p53* representan la alteración genética más frecuente en el cáncer humano. Esta mutación se ha observado sólo en determinados LNH, como en los linfomas foliculares avanzados y de Burkitt. La eliminación cromosómica más frecuente es la 6(6q) en su brazo largo, traduciéndose en la pérdida de los genes supresores tumorales. Esta anormalidad está asociada con un mal pronóstico en LNH. En los linfomas B de células pequeñas y la leucemia linfática crónica, la eliminación del cromosoma 13q14 se observa en el 50% de los casos ¹⁸.

Los agentes infecciosos causantes de LNH pueden clasificarse según sus mecanismos en tres grupos: los que transforman a los linfocitos, los que causan

disminución de linfocitos T CD4⁺ causando un síndrome de inmunodeficiencia adquirida y los que causan una estimulación inmune crónica ¹⁹.

Los virus que causan transformación de los linfocitos son el virus de Epstein Barr (EBV), asociado a linfoma Burkitt endémico y a LNH extranodal de células NKs; el virus herpes humano 8 (HHV8), asociado a linfomas de efusión primaria y DLCBLs relacionados, y a LNH plasmablastico asociado con la enfermedad multicéntrica de Castleman; y el virus linfotrópico T humano tipo 1 (HLTV-1) asociado con linfoma/leucemia de células T en adultos ¹⁹.

El VIH causa una seria disminución de linfocitos T CD4⁺, lo cual se ha asociado a LNH debido a que mientras menor sea la cuenta de linfocitos T CD4⁺ en pacientes con VIH mayor es el riesgo de desarrollar LNH ²⁰. EBV está frecuentemente involucrado a LNH asociados con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Los LNH asociados a SIDA son de sistema nervioso central (casi siempre positivo a EBV), linfoma difuso de células B grandes (aproximadamente 50% positivos a EBV) y linfoma Burkitt (aproximadamente 30% positivos a EBV). Los pacientes con SIDA tienen mayor riesgo a desarrollar dichos subtipos de LNH. El riesgo de desarrollar LNH de sistema nervioso central o DLBCL aumenta linealmente en función a la disminución de linfocitos T CD4⁺ ¹⁹.

El virus de hepatitis C (HCV) es un ejemplo de agente infeccioso que causa estimulación inmune crónica. La infección persistente con este virus está asociada a desorden linfoproliferativo de bajo grado que puede progresar a LNH probablemente debido a la interacción del virus con receptores de superficie del linfocito B, lo que puede inducir mutaciones o anergia en la respuesta antigénica. Pacientes infectados con HCV tienen una mayor prevalencia de linfocitos circulantes con la translocación t (8;14)(q24;q32) asociada con LNH. No se sabe si HCV está asociado con algún subtipo de LNH o con los LNH en general ¹⁹. Otro agente infeccioso que causa estimulación inmune crónica es *Helicobacter pylori*, el cual ha sido asociado a linfoma gástrico (LNH de MALT) ¹⁹.

El avance del conocimiento de la fisiopatogenia del sistema linfoide ha permitido a los patólogos clasificar los LNH en diferentes subgrupos. Estas clasificaciones tienen 2 objetivos fundamentales:

- Agrupar estas entidades desde el punto de vista morfológico, por criterios citohistológicos precisos, basados en el aspecto fenotípico.
- Definir entidades con características clínicas y evolutivas particulares como pueden ser el riesgo de enfermedad extraganglionar, diseminación a médula ósea o sistema nervioso central, permitiendo así un adecuado tratamiento y pronóstico, así como determinar la fase de recuperación en la que se encuentra el paciente.

4. Tratamiento

El tratamiento para los pacientes con LNH depende del estadio y del tipo histológico. Las tomografías computarizadas de tórax y abdomen habitualmente forman parte de la evaluación para la estadificación de todos los pacientes con linfoma. El sistema de subclasificación por estadios (I, II, III y IV) se basa en el número de órganos linfáticos o extralinfáticos comprometidos y en su localización anatómica ²¹. Los LNH se pueden dividir en dos grupos de acuerdo con sus pronósticos:

Linfomas indolentes o de crecimiento lento: tienen un pronóstico relativamente bueno, con supervivencia media de hasta 10 años, pero generalmente no son curables en sus estadios clínicos avanzados. La mayoría tienen morfología ganglionar (o folicular). En los estadios I y II, se puede lograr un control de la enfermedad a largo plazo en un número significativo de pacientes usando radioterapia dirigida hacia el al sitio afectado o de campo extendido, el cual incluye sitios ganglionares adyacentes. Casi la mitad de los pacientes tratados con radioterapia solamente presentará recaída en un plazo de 10 años. Cuando se contraindica la radioterapia, se puede administrar quimioterapia a pacientes sintomáticos o se puede considerar la conducta expectante para los pacientes asintomáticos ²².

El tratamiento óptimo para los estadios III y IV es polémico debido a las tasas bajas de curación con las opciones terapéuticas disponibles en el presente. La tasa de recaída es constante aun en pacientes que respondieron por completo al tratamiento, de hecho puede presentarse una recaída muchos años después. Sin embargo, los pacientes a menudo pueden volver a tratarse con bastante éxito, mientras que la histología de la enfermedad permanezca en un grado bajo. El tratamiento estándar incluye rituximab solo o combinado con análogos de los nucleótidos de las purinas, como fludarabina o 2-clorodeoxiadenosina, alquilantes orales (con esteroides o sin ellos) o quimioterapia combinada^{23, 24}. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos es curativo en el estadio avanzado de la enfermedad.

Linfomas agresivos o de crecimiento rápido: tienen una evolución natural más corta pero los pacientes cuyo LNH se presenta en forma dinámica o se vuelve de crecimiento rápido pueden tener remisiones completas sostenidas con regímenes de quimioterapia combinada o con una consolidación intensiva por medio de apoyo de trasplante de medula ósea.

Para los estadios I y II, el tratamiento estándar es quimioterapia combinada (CHOP) con rituximab (R-CHOP), pero el uso de R-CHOP con radioterapia dirigida al campo comprometido también ha mostrado mejorías²⁵. Para los estadios avanzados (III y IV) se ha utilizado la quimioterapia combinada pero el tratamiento con R-CHOP mostró mejoría de la supervivencia sin complicaciones y de la supervivencia general en comparación con CHOP en varios estudios clínicos, en pacientes mayores y menores de 60 años de edad en los estadios avanzados²⁶. La gran mayoría de recaídas se presenta en los primeros dos años después de terminar el tratamiento.

En cuanto a radioterapia, la dosis de radiación oscila generalmente entre 25 y 50 Gy según el tipo histológico del linfoma, el estadio y la condición general del paciente, la meta del tratamiento (curativa o paliativa), la proximidad de órganos adyacentes sensibles y si el paciente se está tratando con radioterapia sola o en combinación con quimioterapia. La mayoría de los pacientes que reciben radiación

se tratan generalmente en un solo lado del diafragma.²¹. Entre los efectos adversos de la radioterapia incluyen reacciones en piel, complicaciones estomacales, cansancio y pérdida de motilidad intestinal ²².

En la actualidad existen muchos regímenes de quimioterapia potencialmente eficaces. Como se ha mencionado, los fármacos quimioterapéuticos pueden administrarse individualmente para los linfomas de bajo grado o bien agrupados en combinación entre ellos en el caso de los linfomas de grado alto. La quimioterapia estándar tiene una utilidad limitada cuando existen recaídas. Se están probando nuevos regímenes de fármacos que son más tóxicos que otros tratamientos pero ofrecen más posibilidades de curar el linfoma. La quimioterapia combinada con base en doxorubicina produce períodos de supervivencia a largo plazo sin enfermedad en 35 a 45% de los pacientes y en general, con la quimioterapia combinada el 50-60% de los pacientes en estadio avanzado pueden curarse ²³.

CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) es la quimioterapia combinada más utilizada en DLBCL. Cada fármaco tiene un mecanismo de acción diferente (agente alquilante, inhibidor de la formación de huso cromático, bloqueo de polimerización de tubulina, inhibición de síntesis de proteínas, respectivamente), pero todos inducen la muerte de células con un potencial elevado de proliferación. Sin embargo este tratamiento es inespecífico, por lo que suele traer muchas reacciones adversas, además de que muchos pacientes pueden volverse refractarios al tratamiento.

A causa de que la quimioterapia bloquea rápidamente la división celular, incluyendo a los tejidos normales tales como el pelo, mucosas de la boca, intestinos y médula ósea, los pacientes que reciben el tratamiento pueden perder el pelo, presentar llagas en la boca, así como tener náuseas y vómito. Además, los fármacos empleados en la quimioterapia suprimen la defensa del organismo haciéndolo más susceptible a las infecciones, ocasionando daño en tejidos y sangrados espontáneos. Estos efectos pueden ser controlados durante el tratamiento y éste es generalmente completado. La severidad de estos efectos

depende del tipo y cantidad de fármaco administrado, así como del tiempo de tratamiento ²⁷.

El trasplante de médula ósea es otra alternativa para el tratamiento de pacientes con LNH. Este procedimiento permite que la cantidad de células sanguíneas, que se encuentra reducida por las altas dosis de quimioterapia, se recupere más rápidamente. Esta alternativa es eficaz en la mayoría de los casos en personas menores de 55 años. Aunque permite la curación del 30 al 50% de los pacientes que no se recuperan mediante la quimioterapia, presenta algunos riesgos. Aproximadamente el 5% de los pacientes muere a causa de una infección durante las primeras semanas posteriores al trasplante, antes de que la médula ósea se recupere y pueda producir suficientes leucocitos.

El uso de anticuerpos monoclonales para el tratamiento de pacientes con linfoma inició hace un poco más de diez años ampliándose en el tratamiento de linfomas indolentes ²⁸. Como terapia para el cáncer, los anticuerpos son inyectados a los pacientes para dirigir el inicio de la respuesta inmune contra los tumores o para interferir con la funcionalidad de las células tumorales. Hay diversas presentaciones para los anticuerpos monoclonales como terapia, entre estas se tienen a los anticuerpos sin conjugar o nativos en contra de linfomas y a los anticuerpos conjugados a citocinas, radioisótopos o toxinas, también llamados proteínas de fusión ²⁹.

Los anticuerpos anti-CD20 han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de linfomas de linfocitos B ³⁰. El más empleado actualmente es rituximab, el cual es un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20 ²⁹. Los anticuerpos no modificados como rituximab, se unen al antígeno de superficie celular (en este caso CD20), induciendo lisis celular mediante citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Este mecanismo inmune parece ser efectivo tanto en linfomas indolentes como en linfomas más agresivos. El rituximab ha demostrado buena actividad clínica en el tratamiento de recaídas de LNH indolentes de linfocitos B CD20⁺, particularmente en pacientes con LNH folicular ^{31, 32}. Su eficacia terapéutica está asociada con su limitada

toxicidad, consistiendo principalmente de eventos relacionados a la infusión como fiebre, dolores y escalofríos. Se ha utilizado también para el tratamiento de enfermedades autoinmunes con la idea de interferir en la producción de autoanticuerpos ^{33, 34}. Ha sido exitosamente usado en estudios preliminares de artritis reumatoide ³⁵, trombocitopenia púrpura idiopática crónica ³⁶, y en pacientes con lupus eritematoso sistémico ³⁷.

También se ha empleado rituximab en combinación con otros tratamientos tales como IL-2 o IL-12 para aumentar la actividad citotóxica de las células ^{38, 39}, con anticuerpos dirigidos contra otros blancos en linfocitos B como epratuzumab (anti-CD22)⁴⁰ y con CpG para inducir una síntesis múltiple de citocinas y respuesta inmune activada por receptores de la respuesta innata ⁴¹. Asimismo se ha combinado rituximab con la terapia sistémica de interferón-alfa (IFN α), mostrando beneficios al añadir esta citocina ^{42, 43}. IFN α es miembro de la familia de interferones tipo 1; es una citocina pleiotrópica con propiedades anti-proliferativas y pro-apoptóticas en contra de LNH y otros cánceres, causa represión de la expresión del oncogen c-myc, baja de regulación de la actividad de la telomerasa e inhibición de angiogénesis ⁴⁴. Entre los efectos inmunológicos favorables de IFN α contra linfoma se encuentran tanto la activación de células T, NK y dendríticas como el aumento en la expresión de MHC I y de CD20 en la superficie de las células tumorales. Sin embargo, la utilidad clínica de IFN α en la terapia contra el cáncer es limitada por las toxicidades asociadas a su administración sistémica ⁴⁵.

5. CD20 y su vía de señalización

CD20 es una fosfoproteína no glicosilada de 33 a 37 kDa expresada en la superficie celular de más del 95% de los linfocitos B normales y neoplásicos. Esta proteína se encuentra expresada desde la etapa pre-B del desarrollo de los linfocitos B hasta la diferenciación a células plasmáticas. La secuencia de aminoácidos sugiere que la estructura de CD20 tiene 4 regiones transmembranales con los extremos amino y carboxilo terminal del lado citoplasmático de la membrana ⁴⁶.

Se ha mostrado que anticuerpos monoclonales anti-CD20 tienen efectos variables en la proliferación de células B después de unirse a CD20; por ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 1F5 estimula la transición de ciclo celular de la fase G0 a la G1 mientras que el anti-CD20 B1 inhibe la progresión de la fase G1 a las fases S/G2+M después de estimulación mitógena ⁴⁶.

CD20 ha sido un antígeno atractivo para la inmunoterapia selectiva porque no circula libremente en el plasma, porque no se libera de la superficie membranal de las células al unirse con un anticuerpo y porque no se internaliza ni se disminuye su expresión ²⁹.

La función exacta de CD20 no se conoce del todo. Se sabe que esta proteína está asociada a tirosina cinasas de la familia Src, entre las cuales se encuentran lyn, fyn, lck y p75/80 ⁴⁷. El entrecruzamiento de CD20 mediante anticuerpos provoca una redistribución de CD20 en microdominios especializados ubicados en la membrana celular llamados balsas lipídicas ⁴⁸, y puede inhibir o promover apoptosis, dependiendo del anticuerpo utilizado, el estadio de diferenciación del linfoma y otras señales recibidas por las células ⁴⁹.

El entrecruzamiento de CD20 con rituximab, después de causar una redistribución de CD20 en balsas lipídicas, induce la fosforilación de ciertos residuos de tirosina de la fosfolipasa C-gamma (PLC γ) mediante cinasas de la familia Src ⁴⁹. Los efectos pleiotrópicos de PLC γ implicados en la señalización por el entrecruzamiento de rituximab son la activación de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), específicamente JNK, ERK y p38MAPK ⁵⁰, y la hidrólisis de PIP₂, generando inositol trifosfato y un flujo de calcio. Este flujo de calcio ha sido asociado a la apoptosis mediada por CD20 ⁵¹. Cuando PLC γ hidroliza PIP₂ también se genera diacilglicerol, lo cual activa a la protein-cinasa C(PKC); sin embargo esta vía aún no ha sido estudiada como un potencial mecanismo para la actividad de CD20 ⁴⁹ (Ver Figura 1). Se han encontrado varias similitudes entre estas vías de señalización y aquellas inducidas por el receptor de linfocitos B (BCR) ⁵².

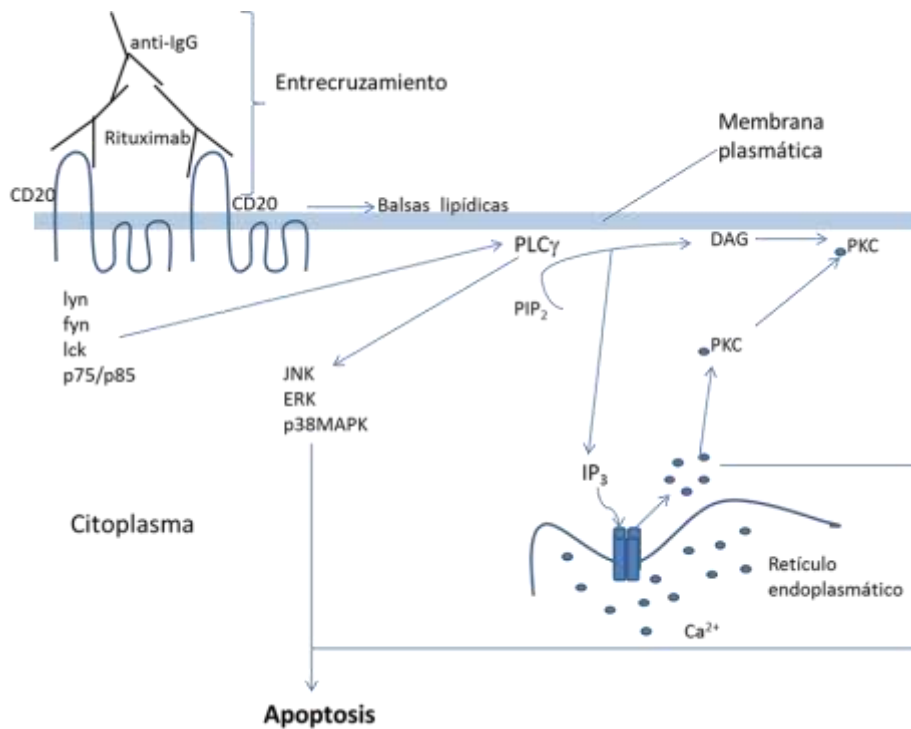


Figura 1. Inducción de apoptosis mediante el entrecruzamiento de CD20 con rituximab. El entrecruzamiento de CD20 con rituximab desencadena la movilización de CD20 a balsas lipídicas y la fosforilación de la fosfolipasa C- γ (PLC γ) a través de diferentes proteínas asociadas a CD20. La activación de PLC γ permite tanto el flujo de calcio (Ca^{2+}) del retículo endoplasmático hacia el citoplasma como la activación de MAPK, lo cual conlleva a la apoptosis celular.

La intensidad de transducción intracelular de señales, al menos en algunos sistemas, puede ser afectada por el agrupamiento (clustering) de CD20⁵¹. Este agrupamiento de CD20 ha sido directamente relacionado con el entrecruzamiento mediante anticuerpos, lo cual amplifica la señalización; es decir, mientras que con la unión de un anti-CD20 soluble a CD20 se observa activación de tirosina cinasas y un flujo de calcio, una señalización cuantitativamente más pronunciada se observa al usar anticuerpos anti-CD20 homodimerizados⁵³ o al entrecruzar el anticuerpo ya sea por un anticuerpo secundario⁵⁴ o por células que expresen receptores de Fc γ ⁴⁹ (Ver Figura 1).

El hiper entrecruzamiento de CD20 puede inducir un incremento en la expresión de Fas y en la actividad de las caspasas, con la consecuente inducción de apoptosis^{46, 51}. Este efecto ha sido demostrado en diferentes líneas celulares de linfocitos B,

pero actualmente no existe evidencia que demuestre que el hiperentrecruzamiento incrementa y que además sea esencial para la inducción de apoptosis *in vivo*.

La muerte celular provocada por la unión de rituximab a CD20 puede ser mediada a través de CDC, ADCC y apoptosis. La apoptosis mediada por rituximab es consecuencia de la activación de las caspasa-3 y 9 pero no de la 8, lo cual ha sido apoyado por estudios con pacientes con CLL en donde también se observó una disminución de las proteínas anti-apoptóticas XIAP y mcl-1 ⁵⁵. Por lo tanto, la vía mitocondrial es importante para la apoptosis mediada por rituximab.

Se sabe que algunas líneas celulares de LNH resistentes a quimioterapia se sensibilizan a apoptosis inducida por quimioterapia después de tratarlas con rituximab. Esto ocurre mediante la inhibición de la expresión de las moléculas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL.

En las líneas celulares de LNH, rituximab inhibe la vía de p38 MAPK lo que lleva a la inhibición del factor de transcripción SP-1, el cual regula la expresión de IL-10. Al inhibirse la expresión de IL-10, que actúa como un factor autocrino/paracrino, se inhibe la activación de STAT3, mediada por IL-10/IL-10R, lo que resulta en una inhibición de la expresión constitutiva de Bcl-2 ⁵⁶⁻⁵⁸.

También se ha demostrado que en líneas celulares de LNH, rituximab inhibe la vía de ERK1/2, resultando en la inhibición del factor de transcripción AP-1 y por lo tanto de la expresión de Bcl-xL ⁵⁹. Además, el tratamiento con rituximab induce la expresión de RKIP ⁶⁰, que es un regulador negativo de la vía de ERK1/2 ⁶¹. La expresión de Bcl-xL también está regulada por NF- κ B y rituximab induce una disminución de la fosforilación de IKK e I κ B κ , de la actividad de IKK y de la actividad de unión a DNA de NF- κ B, provocando la desregulación de Bcl-xL ⁵⁹. Además RKIP también inhibe a NF- κ B ⁶¹.

Otra de las vías que regula la expresión de Bcl-xL es la vía de AKT. En las líneas celulares Daudi y Ramos, el tratamiento con rituximab inhibe los estados fosforilados de AKT y Bad sin efecto alguno en las formas no fosforiladas. Bad no fosforilado se asocia con Bcl-xL inhibiendo su función y causando

quimiosensibilidad⁵⁹. Además la inhibición de AKT inhibe a NF- κ B, resultando en la inhibición de la expresión de Bcl-xL. Rituximab también induce la expresión de PTEN, que es una fosfatasa inhibidora de AKT⁶².

NF- κ B y YY1 activados regulan negativamente tanto la expresión de Fas y la sensibilidad a FasL como la expresión del receptor DR5 y la sensibilidad a TRAIL, por lo que la inhibición de cualquiera de los dos (NF- κ B o YY1) resulta en sensibilidad a apoptosis mediada por FasL y por TRAIL cuando éstos se unen a los receptores Fas y DR5, respectivamente^{63, 64}. Rituximab inhibe la expresión y actividad de NF- κ B y YY1 en líneas celulares de linfoma no-Hodgkin y por lo tanto las sensibiliza a apoptosis mediada por TRAIL y por FasL⁶⁵, lo cual muestra un posible mecanismo de la actividad de rituximab *in vivo* (Ver Figura 2).

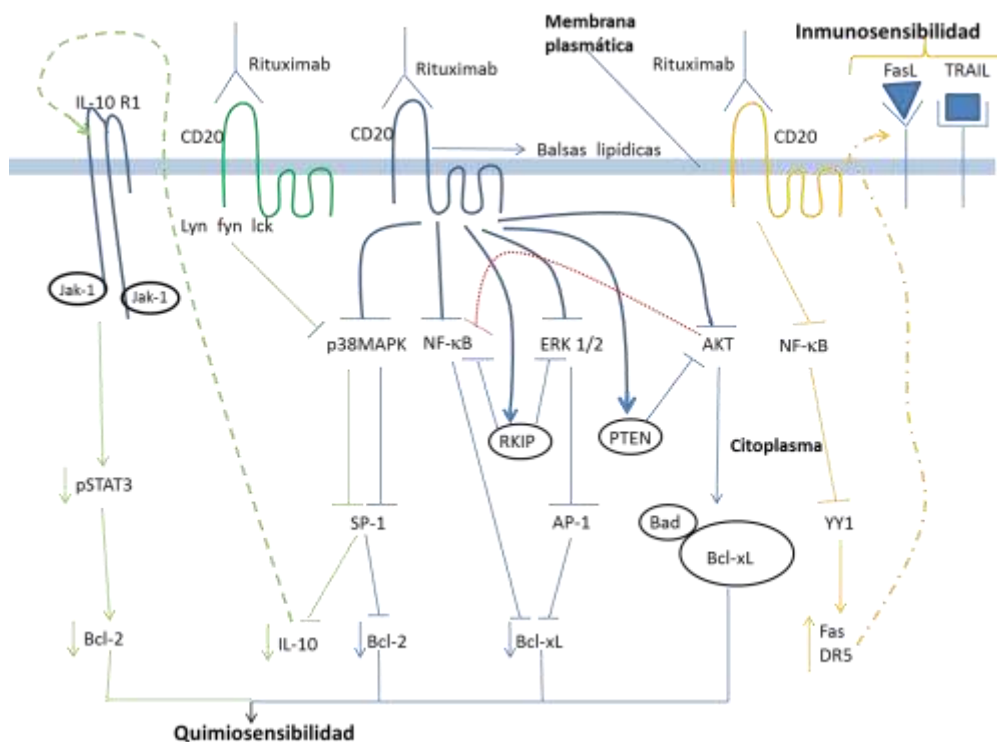


Figura 2. Cascada de señalización inducida por rituximab en LNH. Rituximab es capaz de inducir una gran cascada de señalización que conlleva a la inhibición de NF- κ B, p38MAPK, ERK1/2 y AKT, lo cual resulta en la inhibición de la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL, y en el aumento de la expresión de los receptores DR5 y Fas con la consecuente quimio e inmunosensibilidad en líneas celulares de LNH resistentes a quimioterapia.

6. Interferones tipo 1 y su vía de señalización

Los interferones son proteínas que funcionan como citocinas. Son secretados de forma autocrina y paracrina e inicialmente fueron descritos como factores que confieren resistencia viral a las células pero actualmente se sabe que además tienen acción inmunomoduladora, participan en la diferenciación celular y en la sobrevivencia o muerte células normales y tumorales. Apoyándose en estudios *in vitro* y en el área clínica, se puede determinar que el interferón es un fármaco inmunoterapéutico, con potentes propiedades antitumorales e inmunoestimuladoras. Recientes estudios señalan que la producción de IFN es inducida a través de la activación de los receptores tipo toll (TLR) ⁴⁴. Cerca de 10 distintos interferones han sido identificados en mamíferos y siete de éstos se han descrito en humanos. Estas citocinas se clasifican, según su afinidad a los tipos de receptores de IFN, en tres diferentes grupos:

- IFN Tipo I: Todos los IFN tipo I se unen a un complejo receptor específico en la superficie de la célula conocido como receptor tipo 1 de IFN (IFNAR, por sus siglas en ingles) que consiste en las cadenas IFNAR1 e IFNAR2 ⁶⁶. Los interferones tipo I presentes en el humano son IFN α , IFN β e IFN ω ⁶⁷. Casi todas las células del sistema inmune producen interferones tipo I, las células que expresan principalmente los IFN α e IFN β son los leucocitos y fibroblastos, respectivamente. La inducción de estos interferones es provocada por la exposición a virus, ARN de doble cadena, polipéptidos y citocinas. En la Figura 3 se observan los principales efectos de IFN α en células NK, presentadoras de antígeno, células T y tumorales ⁶⁸.
- IFN Tipo II: Incluye únicamente a IFN γ , el cual se une al receptor tipo II. Este receptor IFNGR consta de dos cadenas IFNGR1 e IFNGR2. Es producido en células T y NK como consecuencia de varios estímulos inmunológicos como antígenos específicos de células T y la enterotoxina A de estafilococo. A diferencia del IFN α y del IFN β , IFN γ no es inducido directamente después de una infección viral ⁶⁸.

- IFN Tipo III: Este señala a través de un complejo de receptores que consiste de IL10R2 (también llamado CRF2-4) e IFNLR1 (también llamado CRF2-12) ⁶⁹.

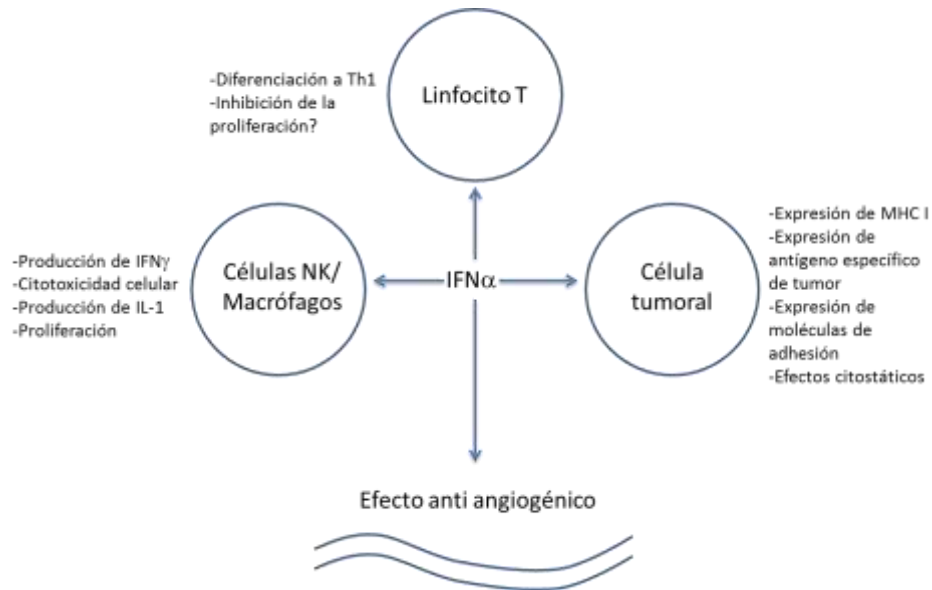


Figura 3. IFN α posee una actividad pleiotrópica y antagónica entre células del sistema inmune y células tumorales. Los efectos de estimulación e inhibición son vistos en linfocitos T. IFN α induce un efecto estimulador en células NK y macrófagos, el cual se ve antagonizado por la inducción de la expresión de MHC-1 en células tumorales. Se ha observado un efecto citotóxico directo en células tumorales, así como incremento en la expresión de antígenos tumorales y de moléculas de adhesión. IFN α también tiene efectos anti-angiogénicos mediados indirectamente por IFN γ (Modificado de Jonasch E, et al 2001).

Los interferones tipo I son proteínas no glicosiladas de entre 165-200 aminoácidos y pertenecen a la familia de citocinas helicoidales con estructuras secundarias de cinco α -hélices sostenidas en posición por dos uniones disulfuro. Este tipo de interferones ejercen su función a través de la unión a su receptor, que como ya se mencionó son dos proteínas de superficie transmembranales expresadas constitutivamente: receptor 1 de IFN (IFNAR1) y receptor 2 de IFN (IFNAR2). Este receptor está asociado a tirosinas cinasas citoplasmáticas TYK2 y JAK1. Una vez que el interferón tipo 1 se une ya sea a IFNAR1 o a IFNAR 2, el ligando recluta al otro IFNAR formándose un complejo ternario. Se sabe que IFNAR2 tiene una afinidad 1000 veces mayor a IFN que IFNAR1, por lo que es más probable que IFN

se una a IFNAR 2 y luego reclute a IFNAR1. Estudios acerca de las afinidades de los interferones sugieren que las diferentes afinidades de los IFNARs, y por lo tanto la estabilidad de los complejos ternarios, controlan las diferentes acciones biológicas de los interferones ⁴⁴.

La formación del complejo ternario (IFNAR2-IFN-IFNAR1) resulta en la autofosforilación y transfosforilación de JAK1 y TYK2, permitiendo la fosforilación de ciertos residuos de tirosina en los receptores. Después, JAK1 y TYK2 activadas fosforilan y activan a STAT2 y STAT1, respectivamente. STAT2 y STAT1 activos se dimerizan y se unen al factor regulador 9 de IFN (IRF9), formando un complejo llamado factor génico 3 estimulado por IFN (ISGF3) que transloca al núcleo y se une a un elemento de respuesta estimulado por IFN (ISRE) en las regiones promotoras de los genes estimulados por IFN (ISG) ^{44, 70} (Ver Figura 4).

En algunas líneas celulares, la subunidad p85 de fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K) está asociado a IFNAR1. La activación de p85 por IFN resulta en la fosforilación de AKT y en la expresión del gen CXCL11 (que codifica una importante quimiocina). Los interferones tipo 1 también activan p38, y la inactivación de p38 bloquea la inducción de los genes CXCL11 y TNFSF10 (que codifica al ligando que induce apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral APO2L/TRAIL) causada por IFN β y de CXCL10 (codifica la quimiocina IP-10 o péptido inducido por IFN γ) en leucocitos primarios ⁴⁴.

Una función importante de la activación de proteínas serina cinasas, como p38 y PKC en respuesta a la señalización por IFN, es la fosforilación directa o indirecta de factores de transcripción. La activación de PI3K, ERKs y p38 por IFN estimula la fosforilación de NF κ B (pero no I κ B), AP-1 y posiblemente de PU.1, respectivamente. Estos factores de transcripción activados pueden conducir a la expresión de genes independiente de los STATs o pueden cooperar con los STATs activados en ciertos promotores³⁷.

La transcripción iniciada por la activación de STATs no continúa de manera indefinida; la homeostasis resulta de la acción de las fosfatasas SHP1 y SHP2, y

de una familia de ISGs: proteínas supresoras de señalización por citocinas (SOCS), las cuales inhiben la señalización del receptor inhibiendo directamente a las JAKs y marcando al complejo del receptor para que sea degradado por el proteasoma³⁷.

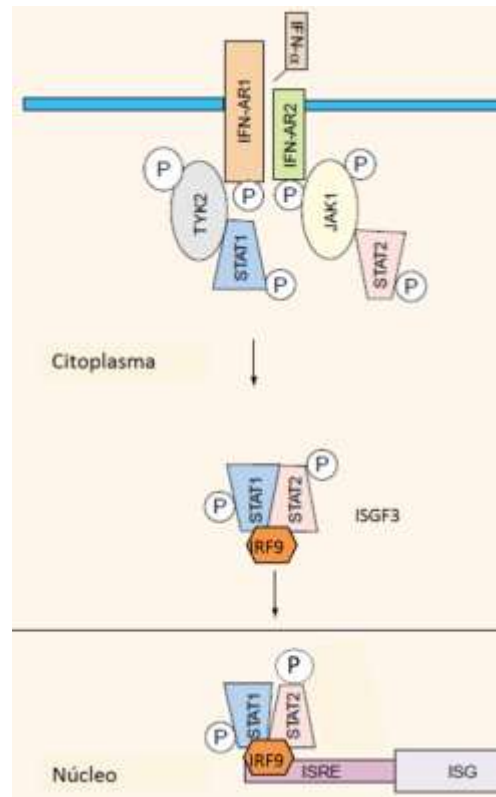


Figura 4. Señalización inducida por IFN α . Para los interferones tipo 1 se conocen dos subunidades del receptor, IFNAR1 e IFNAR2, los cuales están unidos a JAK1 y a TYK2, respectivamente. Después de la unión del IFN α con una de las subunidades de su receptor, el receptor sufre oligomerización, luego sucede una transfosforilación de las JAKs seguido de la fosforilación de las colas citoplásmicas del receptor. Esto permite un acoplamiento para los traductores y activadores de la transcripción (STATs), los cuales son fosforilados por las JAKs. Los STATs fosforilados son liberados desde los receptores, se dimerizan y se unen al factor regulador 9 de IFN (IRF9) para translocar al núcleo, donde activan la transcripción de genes estimulados por IFN (ISGs). Los ISGs pueden ser identificados por la presencia de un elemento de respuesta inducido por IFN (ISRE) en su región promotora. (Modificado de Jonasch E, et al 2001).

La respuesta celular a interferones está condicionada por la exposición previa de la célula a otras citocinas y, de manera inversa, los interferones condicionan la respuesta celular de otras citocinas.

STAT1 y STAT3 tienen otras actividades además de su papel como factores de transcripción activados por citocinas. Una consecuencia del aumento en la expresión de STAT causado por las citocinas es que STAT1 y STAT3 no fosforilados tienen funciones muy diferentes a su estado fosforilado. Por lo tanto, el papel de los STATs en la señalización después de la unión de la citocina al receptor va más allá de la activación de factores de transcripción por proteínas cinasas, ya que incluso en la ausencia de un ligando activan la transcripción y participan en la especificidad del tipo celular, resultando en diversos patrones de inducción de ISGs en diferentes tipos celulares como respuesta a un solo IFN³⁷.

TRAIL/APO2L y XAF-1 son ISGs que contribuyen a la apoptosis y por lo tanto, probablemente, a los efectos antivirales y antitumorales de los interferones. Aunque muchos ISGs promueven la apoptosis, algunos promueven la supervivencia, por ejemplo el ISG G1P3 que tiene acciones anti-apoptóticas incluyendo inhibición de caspasa-3³⁷.

Muchas proteínas en la vía de señalización de IFN son ISGs, lo cual crea una asa autocrina que amplifica las respuestas de IFN. Algunos ejemplos de estos ISGs son IRF7, RIG-I, MDA5 y STAT1. Todos los efectos biológicos de IFN son mediados a través de la acción de ISGs. Por esto, entender las funciones de sus productos proteicos podría ayudar a desarrollar terapias antivirales y anti-tumorales más eficaces³⁷.

El IFN puede activar algunas otras cascadas de señalización que involucran a los miembros de la familia de las CRK, entre ellos CRKL, la cual funciona como proteína adaptadora de STAT5, también activado mediante la acción de IFN. El efecto específico antiviral y anti-proliferativo del IFN tipo I, resulta de la activación de p38 MAPK. La inhibición de p38MAPK bloquea la transcripción dependiente de IFN α de genes que son regulados por ISREs⁷⁰.

7. IFN tipo 1 en cáncer

Interferón tipo 1 tiene varias funciones biológicas, algunas de ellas son la regulación de la inmunidad innata y adaptativa, así como sus efectos anti-

angiogénicos y pro-apoptóticos, lo que lo convierte en un buen candidato para la terapia contra el cáncer. Se ha utilizado como tratamiento en varios tipos de cáncer, incluyendo malignidades hematológicas (leucemia de células peludas, leucemia mieloide crónica y algunos linfomas de células T y B) y tumores sólidos (melanoma, carcinoma renal y sarcoma de Kaposi). Sin embargo, el efecto antitumoral de la terapia con interferón tipo 1 está acompañado de efectos adversos como síntomas autoinmunes e inflamatorios y una gran toxicidad ⁴⁵. Esta toxicidad puede verse reflejada en efectos constitucionales, neuropsiquiátricos, hematológicos y hepáticos que tienen un gran impacto en la calidad de vida del paciente. En algunos tipos de cáncer, por ejemplo en leucemia de células peludas, el uso de IFN α se ha sustituido por terapias más efectivas como la 2-desoxicoformicina y cladribina. En otros casos, como en carcinoma renal metastásico, se han intentado terapias combinadas de IFN α con agentes quimioterapéuticos como 5-fluorouracilo o con otras citocinas como IL-2, pero no han tenido éxito en demostrar una mayor supervivencia comparado con la monoterapia con IFN α ⁶⁸.

En el caso de linfoma folicular, dos estudios de fase III han demostraron una mayor duración de la remisión al usar agentes alquilantes combinados con IFN α . Uno de estos estudios resultó en una mayor supervivencia sin progresión de la enfermedad y en una supervivencia general en el grupo de pacientes que recibió quimioterapia citotóxica en combinación con IFN α ⁷¹. También se ha evaluado la terapia de mantenimiento con IFN α en pacientes con linfoma no-Hodgkin de bajo grado en los que hubo una reducción en el tamaño del tumor, mostrándose en la mayoría de los estudios un incremento en la tasa de supervivencia sin recaídas pero no una clara mejoría en la supervivencia general, por lo que algunos autores recomiendan su uso en combinación con quimioterapia para linfoma folicular agresivo y como terapia de mantenimiento en pacientes con alto riesgo de recaídas después de la terapia citotóxica ⁶⁸.

En el caso de leucemia mielocítica crónica se ha visto un mayor índice en la respuesta cariotípica en aquellos pacientes tratados con monoterapia de IFN α que

en los tratados con quimioterapia. También se ha probado la combinación de IFN α con citarabina, obteniéndose una mayor índice de remisión hematológica completa comparado con la monoterapia con IFN α , mejor supresión del gen Filadelfia y mayor supervivencia ⁶⁸.

En melanoma metastásico, la monoterapia con IFN α induce respuestas de aproximadamente 15% y remisión completa del 5%. La combinación de IFN α con IL-2 no muestra un incremento significativo en el índice de respuesta pero sí más efectos adversos. La quimio-inmunoterapia muestra mayor índice de respuesta pero no se ha traducido a un incremento de la supervivencia general y existe gran toxicidad. La FDA aprobó el uso de IFN α en melanoma de fase III y IIB en el panel adyuvante debido a que en 1996 se encontraron mejoras en la supervivencia general y libre de enfermedad en pacientes con melanoma en fase III ⁶⁸.

Se sabe que IFN tipo 1 no actúa directamente en las células tumorales. Su blanco son las células NK, a través de las cuales regula el crecimiento tumoral, sin embargo no deben descartarse la apoptosis y la autofagia como mecanismo de regulación de la proliferación de células tumorales ⁴⁵.

El IFN α es una citocina pleiotrópica con potentes propiedades antitumorales e inmunoestimuladoras. Es secretada por los linfocitos y puede estimular a los linfocitos B, T y células NK y conducir a la diferenciación de células dendríticas en los sitios donde se alojan algunos tumores. Recientemente se ha demostrado que el IFN presenta actividades anti-proliferativas y pro-apoptóticas hacia algunos tumores, haciéndole esto un buen candidato para desarrollar terapias contra el cáncer. Además de las vías JAK/STAT, en algunas líneas celulares como en linfoma de células B, IFN α activa a MAPKs incluyendo la cinasa extracelular 2 (ERK2), p38 MAPKs y cinasas c-Jun NH₂-terminal (JNKs). Estudios recientes han determinado que las MAPKs activadas por los receptores de IFN α se encuentran río abajo de varios componentes, incluyendo la proteína cinasa C (PKC). PKC δ es una de las nuevas PKCs (δ , ϵ y θ), que son independientes de calcio y activadas por diacilglicerol. PKC δ se fosforila y activa en respuesta a ciertos agentes,

incluyendo $\text{IFN}\alpha$, lo cual media apoptosis en algunas líneas celulares y sobrevivencia en otras. En un estudio reciente con líneas celulares de linfoma se determinó que la señalización de $\text{PKC}\delta$ inducida por $\text{IFN}\alpha$ causa la activación de JNK, lo cual resulta en apoptosis mediada por TRAIL. El promotor de TRAIL contiene posibles ISRE y sitios AP-1, los cuales tal vez estén implicados en la activación del promotor de TRAIL. Se sabe que JNK induce la fosforilación de c-Jun, el cual interacciona con c-Fos y forma un heterodímero cJun/c-Fos (AP-1). También se sabe que esta señalización de $\text{PKC}\delta$ inducida por $\text{IFN}\alpha$ está involucrada en la fosforilación de STAT1 en la serina 727. La activación de STAT1 favorece la inducción de apoptosis en algunos modelos ⁷² (Ver Figura 5).

Bcl-6 es un represor transcripcional expresado en las células B de centro germinal y en células pre-BII pequeñas en reposo, y sobre expresado en linfomas de células B derivados de centro germinal como el linfoma Burkitt, jugando un papel central en la patogénesis de esta enfermedad ⁷³. Las vías que Bcl-6 regula de manera negativa son la señalización de CD40 y BCR, apoptosis, respuesta a daño de ADN, señalización de TLR y de $\text{TGF}\beta$, entre otras ⁷⁴. En un estudio reciente con líneas celulares derivadas de linfoma Burkitt endémico y esporádico se determinó que los interferones tipo 1 inhiben la expresión de la proteína Bcl-6 y de su mRNA en las líneas endémicas pero no en las esporádicas. Este efecto es específico para Bcl-6, independiente de EBV y no está acompañado de la sobre regulación del factor regulador de interferón (IRF-4), que suprime la transcripción de Bcl-6, ni por la desregulación del mRNA de IRF8 el cual activa directamente la transcripción de Bcl-6. La inhibición de la expresión de Bcl-6 ocurre de manera directa por la señalización de IFN tipo 1, probablemente a través de la fosforilación de STAT5 por TYK2 ⁷³ (Ver Figura 5).

Sin embargo, el efecto antitumoral de la terapia con interferón tipo 1 está acompañado de efectos adversos como síntomas autoinmunes e inflamatorios y una gran toxicidad ⁴⁵. Esta toxicidad puede verse reflejada en efectos constitucionales, neuropsiquiátricos, hematológicos y hepáticos que tienen un gran impacto en la calidad de vida del paciente y parece estar directamente relacionada

con la dosis y duración de la terapia con IFN α . La toxicidad puede ser aguda o crónica. Dentro de los síntomas de la toxicidad aguda se encuentran fiebres, fríos y temblores que ocurren a las 3-6 h de administrar el IFN α , también puede haber dolor de cabeza, dolor muscular y malestar general. Con la administración prolongada e ininterrumpida de IFN α se puede desarrollar tolerancia a estos síntomas. Dentro de los síntomas de toxicidad crónica se encuentran fatiga (70-100% de los pacientes), anorexia (40-70%) y síntomas neuropsiquiátricos (>30%)

68

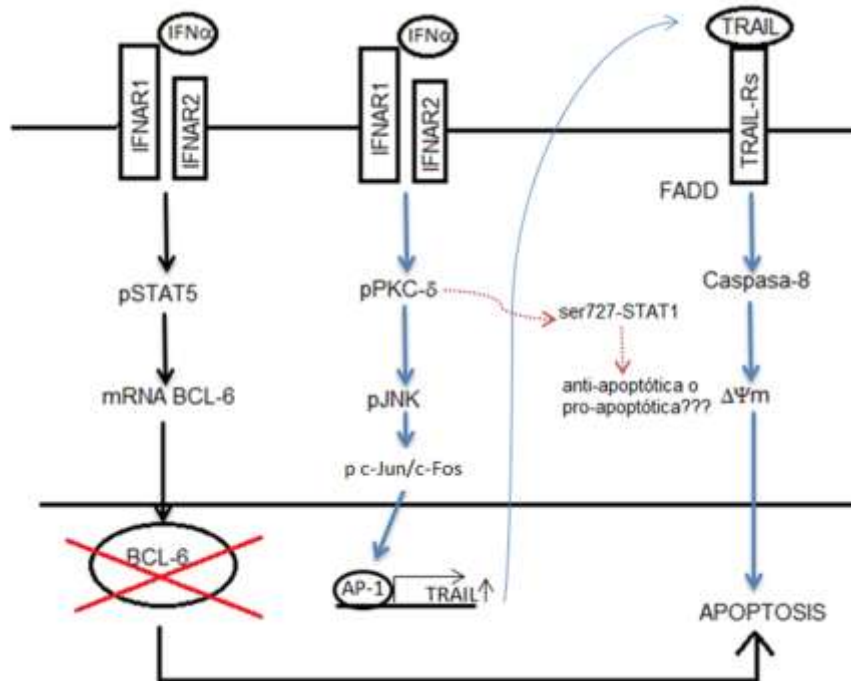


Figura 5. Señalización inducida por IFN α en líneas celulares de LNH. IFN α induce activación de la vía de PKC- δ causando activación de JNK, lo que incrementa la expresión de TRAIL y la apoptosis mediada por este. De igual manera la señalización de PKC- δ inducida por el IFN α puede involucrar la fosforilación de la serina 727 de STAT1 afectando el balance pro-apoptótico/anti-apoptótico de la célula. Por otro lado se ha descrito que IFN α inhibe la expresión de Bcl-6 mediante la activación de STAT5, lo que conlleva a la inhibición de proliferación y muerte celular.

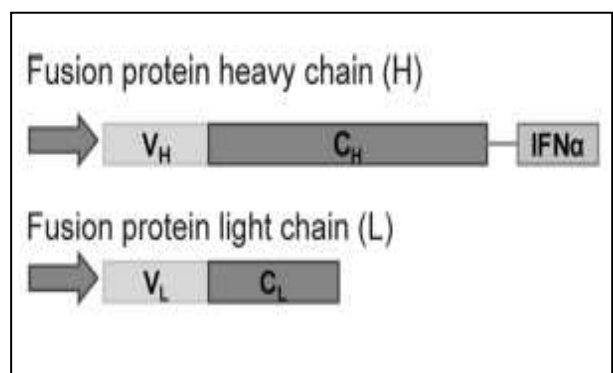
Los factores que contribuyen a esta toxicidad son el tiempo de vida media en suero de IFN α es muy corto (5h) y que solo el 0.01% de la dosis inyectada vía subcutánea alcanza el sitio blanco. Debido a las limitaciones de la terapia con IFN α se han explorado nuevas alternativas para dirigir esta citocina de manera segura y efectiva al tumor, por ejemplo vía monocitos transformados con vectores

adenovirales, en un modelo de carcinoma metastásico y glioma, con resultados alentadores en la inhibición de crecimiento tumoral y angiogénesis, sin embargo el uso de vectores virales en humanos es problemático ⁷⁵. Una alternativa que mejora la eficacia y reduce la toxicidad es dirigir IFN α vía anticuerpo en una proteína de fusión. En el caso de linfoma no-Hodgkin de células B este anticuerpo es un anti-CD20.

8. Proteína de fusión (anti-CD20-hIFN α)

Las proteínas de fusión anticuerpo-citocina utilizan la capacidad única de los anticuerpos de unirse específicamente a un antígeno para guiar agentes antitumorales a la cercanía del tumor, dónde estos pueden actuar de manera más efectiva en la erradicación de la célula tumoral. Recientemente se ha producido y caracterizado la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α en la Universidad de California, Los Angeles (UCLA) ⁷⁶, la cual representa una posible alternativa para el tratamiento de LNH de linfocitos B. Para producir esta proteína de fusión, se clonaron las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anti-CD20 2B8 en vectores que expresan los dominios constantes de las cadenas pesada γ 1 y ligera κ de humano, respectivamente, para obtener un anti-CD20-IgG1. Posteriormente, en un vector, la secuencia del transcrito del IFN α humano (hIFN α) fue ligada de su extremo amino terminal a la secuencia de la región carboxilo terminal de la región constante (C_H) de la cadena pesada de anti-CD20-IgG1 a través de la secuencia que traduce a un péptido Gly₄Ser que funciona como “linker”, lo cual no afecta la habilidad del anticuerpo para unirse a su antígeno ⁷⁶ (Ver Figura 6).

Figura 6. Producción de la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α . La región variable de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo anti-CD20 2B8 fueron clonados dentro de un vector de expresión de las cadenas pesadas humanas γ 3 y la cadena humana κ ligera. La secuencia del IFN α humano fue insertada con un “linker” (Gly₄Ser) después del dominio C_{H3} de la región constante. (Tomado de Xuan, et al 2010).



En células Daudi se evaluó la actividad de la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α . El tratamiento con anti-CD20-hIFN α indujo significativamente mayor porcentaje de apoptosis (31.7%) que el tratamiento con rituximab. Con este estudio se demostró que anti-CD20-hIFN α tiene una potente actividad antitumoral contra células de linfoma humano, la cual es dependiente de la unión de IFN α vía anti-CD20 en la superficie de la célula tumoral ⁷⁶.

En un modelo murino de xenotrasplante se demostró que anti-CD20-hIFN α es capaz de provocar una regresión rápida y uniforme del tumor (7 de 7 ratones) en comparación con el tratamiento con rituximab (2 de 5 ratones) y el control tratado con HBSS (1 de 5). La supervivencia general de los ratones tratados con la proteína de fusión fue significativamente mayor que la de los ratones tratados con rituximab, mientras que los ratones tratados con rituximab no mostraron una mejor supervivencia comparado con el control ⁷⁶.

Debido a la naturaleza multifuncional de la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α es importante saber el mecanismo mediante el cual ejerce su actividad anti-proliferativa y pro-apoptótica. Experimentos *in vivo* usando 38C13-huCD20 IFNAR Knock down, una línea celular con una baja expresión de IFNAR, resultaron en una disminución de la sensibilidad a la apoptosis causada por anti-CD20-mIFN α sugiriendo que la actividad antitumoral de la proteína de fusión es mediada por la interacción de IFN α con su receptor IFNAR ⁷⁶. Anti-CD20-hIFN α tiene gran potencial para convertirse en una terapia versátil, ya que podría usarse en combinación con rituximab o con quimioterapia para aumentar su actividad antitumoral, o bien podría utilizarse como monoterapia para aquellos pacientes en los que los tumores refractarios a rituximab emergen con nuevos mecanismos., pues al tener dos vías de ataque para inducir apoptosis: CD20 e IFNAR, seguiría siendo eficaz incluso en tumores con desregulación en las vías de señalización de CD20 ⁷⁶.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente el cáncer sigue siendo un problema importante de salud a nivel mundial y de manera importante las malignidades hematológicas. Si bien actualmente se cuenta con alternativas terapéuticas más efectivas y específicas como la inmunoterapia combinada, aún existen un número considerable de pacientes que no responden o son refractarios a este tipo de terapias. En el caso de rituximab existe un número importante (40%) de pacientes que no responden. Por otro lado también se ha intentado la terapia en estos pacientes con la citocina $IFN\alpha$, sola o en combinación con rituximab, pero se ha presentada una elevada toxicidad. Por lo que se desarrolló una posible alternativa terapéutica como es la proteína de fusión anti-CD20-h $IFN\alpha$. La cual ha mostrado un efecto citotóxico superior que el anticuerpo anti-CD20 solo o en combinación con $IFN\alpha$ en modelos sensibles a rituximab *in vitro* e *in vivo*. El conocer la efectividad de esta proteína de fusión en modelos de LNH resistentes a rituximab, ayudaría a conocer su potencial terapéutico como alternativa en aquellos pacientes resistentes o refractarios a la terapia convencional de R-CHOP

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de las nuevas alternativas terapéuticas para LNH, como el régimen R-CHOP, cerca del 40% de los pacientes no responden y de los que responden inicialmente el 20% se vuelven refractarios al tratamiento, disminuyendo las posibilidades de supervivencia de estos pacientes. Recientemente se desarrolló una proteína de fusión entre un anticuerpo anti-CD20 e $IFN\alpha$, de la cual se conoce su actividad antitumoral en modelos de LNH sensibles a rituximab tanto *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, no se conoce su efectividad en modelos resistentes a rituximab, así como de los posibles mecanismos de acción. En este proyecto se analizó la actividad terapéutica de anti-CD20-h $IFN\alpha$ en líneas celulares de linfoma resistentes y no al tratamiento con rituximab.

HIPÓTESIS

La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α será capaz de inducir apoptosis en líneas celulares de linfoma no-Hodgkin de células B resistentes al tratamiento con rituximab mediante un entrecruzamiento de la vía de señalización del receptor de IFN tipo 1 y CD20.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto de la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α en líneas celulares de linfoma no-Hodgkin de células B humanas resistentes a rituximab y el posible mecanismo de acción que implique la señalización del receptor tipo 1 del IFN y CD20.

Objetivos específicos

Determinar si el tratamiento de líneas celulares de linfomas de células B humanas resistentes a rituximab con la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α induce inhibición en la proliferación.

Determinar si el tratamiento de líneas celulares de linfomas de células B humanas resistentes a rituximab con la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α induce apoptosis.

Determinar el mecanismo de acción de la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α sobre líneas celulares de linfomas de células B humanas resistente a rituximab.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y reactivos

Las líneas celulares de linfoma humano, Ramos, fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC Bethesda, MD). La línea celular 2F7 fue proporcionada por el Dr. Otoniel Martínez-Maza del departamento de Microbiología, Inmunología y Genética Molecular en la escuela de medicina de la UCLA, EUA. Las líneas celulares 2F7 y Ramos resistentes a rituximab (2F7R y RamosR) fueron desarrolladas en el laboratorio de inmunología de la escuela de medicina de la UCLA ⁷⁷. Las células fueron mantenidas en medio suplementado con 4% (v/v) de suero fetal bovino inactivado y cultivadas a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5% con humedad.

El cis-diaminodicloroplatino(II) (CDDP) fue adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) y fue diluido en dimetilsulfóxido (DMSO), adquirido también de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). El anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20 (rituximab) fue adquirido de Genetech Inc. (San Francisco, California, EUA). La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α , fue proporcionada por la Dra. Sherie L. Morrison del departamento de Microbiología, Inmunología y Genética Molecular en la escuela de Medicina de la UCLA, USA.

Ensayos de viabilidad

La viabilidad celular se determinó mediante ensayos colorimétricos con la sal 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-S-sulfofenil) H-tetrazolio-5carboxanilida (XTT), utilizando un kit de proliferación celular que fue adquirido de Roche Diagnostics Co (Indianápolis, Indiana, EUA). Se cultivaron las líneas celulares en microplacas de 96 pozos con fondo plano en 100 μ L de medio de cultivo a una densidad de 15 000 células/pozo. Las líneas celulares se trataron con la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α a diferentes concentraciones (5, 10 y 20 μ g/mL), con rituximab a concentraciones equivalentes de anti-CD20-hIFN α , con IFN α a 0.1 μ g/mL y con la combinación rituximab + IFN α por 24 h a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5%. Además de estos tratamientos, se incluyó un control de células sin tratar y un

control de isotipo (IgG).

Al cumplirse el tiempo de incubación se adicionaron 50 μ L/pozo de la mezcla de reactivos del kit de proliferación celular (XTT y un acoplador de electrones) y se incubó 4 horas más a 37 °C y 5% de CO₂. Se determinó la proliferación midiendo la absorbancia espectrofotométrica a 492 y 620 nm de los pozos usando un lector de ELISA (Multiskan FC, Thermo Fisher scientific, Inc USA). La viabilidad de las células no tratadas se estableció como el 100%, calculándose el porcentaje de células viables recuperadas mediante la siguiente fórmula. Cada condición experimental se realizó por triplicado y se calculó la desviación estándar.

$$\% \text{ Células recuperadas} = \left(\frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control sin tratar}} * 100 \right)$$

También se determinó la viabilidad celular mediante ensayos de tinción con azul de tripano. Después de cultivar, tratar e incubar las líneas celulares de igual manera que como se mencionó en el ensayo con XTT, se realizó la tinción haciendo una dilución 1:1 de la suspensión celular con azul de tripano.

Posteriormente se llevó a cabo el conteo de células muertas y vivas en una cámara de Neubauer y mediante la siguiente fórmula se calculó el porcentaje de viabilidad. Cada condición experimental se realizó por triplicado y se calculó la desviación estándar.

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\# \text{ de células muertas}}{\# \text{ de células totales}} * 100$$

Ensayos de apoptosis

Mediante citometría de flujo se determinó la presencia de caspasa-3 activa utilizando un kit de apoptosis anti-caspasa-3-activa-ficoeritrina, siguiendo las instrucciones del proveedor (BD Pharmingen, San Diego, California, EUA). Se cultivaron las líneas celulares a una densidad de 250 000 células/pozo en 2 mL de medio de cultivo en microplacas de cultivo celular de 12 pozos con fondo plano.

Para determinar apoptosis, se incubaron las células tratadas con la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α a diferentes concentraciones (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), con rituximab a concentraciones equivalentes de anti-CD20-hIFN α , con IFN α a 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con la combinación rituximab + IFN α por 24 h a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5%. Además de estos tratamientos, se incluyó un control de células sin tratar y un control de isotipo (IgG). Para determinar la quimiosensibilidad a apoptosis mediada por anti-CD20-IFN α , posterior al tratamiento con anti-CD20-hIFN α , con rituximab, con rituximab + IFN α y con IgG por 24h, las líneas celulares fueron tratadas con CDDP a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 18 h a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5%. Cabe mencionar que en un experimento adicional se determinó la quimiosensibilidad no sólo a 24 h sino también a 48 y 72 h.

Una vez cumplido el tiempo de incubación tanto de los tratamientos para determinar apoptosis como de los tratamientos para determinar quimiosensibilidad, las células se lavaron 2 veces con PBS 1x frío, se resuspendieron en una solución para fijar y permeabilizar que contiene paraformaldehído y saponina (BD Citofix/Cytoperm solution 1x) a una concentración de 1×10^6 células/0.5 mL y se incubaron en hielo por 20 minutos.

Después se centrifugaron a 2 000 rpm y se decantaron para lavarlas 2 veces con un buffer acuoso que contiene saponina, suero fetal bovino y azida de sodio $\leq 0.09\%$ (BD Perm/Wash Buffer 1x) a un volumen de 0.5 mL/ 1×10^6 células a temperatura ambiente.

Por último se realizó la tinción con un anticuerpo de ratón anti-caspasa-3-activa-ficoeritrina, utilizando 20 μL del anticuerpo y 100 μL de BD Perm/Wash Buffer 1x por cada condición experimental. Se incubó por 30 minutos, se lavó cada condición experimental con 1 mL de BD Perm/Wash Buffer 1x y se resuspendió en 0.5 mL del mismo buffer antes de analizar por citometría de flujo. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, San

José, California, EUA), con el software CellQuest Pro (BD Biosciences) y se obtuvo el porcentaje de células caspasa-3-activa positivas.

Electroforesis

Se cultivaron las líneas celulares a una densidad de 1×10^6 células/pozo en 2 mL de medio de cultivo en microplacas de cultivo celular de 6 pozos con fondo plano. Se incubaron las células tratadas con la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α a una concentración de 20 μ g/mL o con rituximab a una concentración equivalente por 24 horas a 37 °C en una incubadora con CO $_2$ al 5%. Además de estos tratamientos se incluyó un control sin tratar. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se lavaron las células 2 veces con PBS estéril centrifugándolas a 1 500 rpm por 5 minutos. Se colocaron en microtubos se adicionaron 100 μ L de Buffer de lisis RIPA (1% NP40, 0.1% SDS, ácido desoxicólico e inhibidores de proteasas) (Roche Diagnostics Co., Indianápolis, Indiana, EUA). Posteriormente las células se lisaron por sonicación.

Los lisados celulares fueron cuantificados con un espectrofotómetro empleando el método de Lowry. Después se les adicionó el buffer de carga Laemmli sample buffer (65.2 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glicerol, 2% SDS y 0.01% azul de bromofenol) (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EUA) y se hirvieron por 10 minutos en baño maría.

Por último se prepararon geles de poliacrilamida para el corrimiento de electroforesis en una cámara mini-blot (Bio-Rad) con un buffer de corrida y con condiciones de corrida: 90 minutos a 80 volts.

Western blot

Los geles obtenidos de la electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando una cámara para electro-transferencia (Bio-Rad) con condiciones de 60 minutos a 100 volts. Después las membranas fueron bloqueadas usando leche descremada al 5% (Bio-Rad) durante 30 minutos en agitación constante.

Posteriormente se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios anti- β -actina de ratón, anti-STAT1 de conejo, anti-Bcl-xL de ratón, anti-Bax de conejo, anti-Bcl-6 de conejo, anti-PKC- δ de conejo, anti-p38 de conejo y anti-p65 de conejo (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, EUA), anti-fosfo-PKC- δ de conejo, anti-fosfo-STAT1 de conejo, anti-fosfo-JNK de ratón, anti-fosfo-p38 de conejo y anti-fosfo-p65 de conejo (Cell Signalling Technology, Denver, Massachussets, EUA) durante toda la noche en agitación constante. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con agitación con PBS (5 minutos cada uno) y se incubaron por una hora con los anticuerpos secundarios cabra anti-ratón IgG conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) o con cabra anti-conejo IgG-HRP, según corresponda.

Por último se hicieron 3 lavados más con PBS y se reveló por el método de quimioluminiscencia. La densidad de cada banda se determinó mediante el software ImageJ 1.46r y se expresó como densidad relativa.

RESULTADOS

Para determinar los efectos de anti-CD20-hIFN α en líneas celulares de linfoma de células B resistentes al tratamiento con rituximab, se realizaron ensayos de viabilidad y apoptosis, tanto en células sensibles al tratamiento con rituximab como en células resistentes. En dichos ensayos las líneas celulares fueron tratadas con rituximab, IFN α , rituximab+ IFN α y un control de isotipo para comparar su efecto con el causado por anti-CD20-hIFN α . En el caso de los ensayos para determinar quimiosensibilidad a apoptosis, se realizaron los siguientes tratamientos adicionales: anti-CD20-hIFN α +CDDP, rituximab + CDDP, IgG + CDDP, rituximab + IFN α + CDDP

La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α inhibe la proliferación de las líneas celulares de LNH resistentes a rituximab

Mediante ensayos con XTT, se determinó si anti-CD20-hIFN α inhibía la proliferación celular de las líneas celulares resistentes al tratamiento con rituximab.

Para esto, las líneas celulares 2F7 y Ramos silvestres, así como sus contrapartes resistentes a rituximab 2F7R y RamosR, fueron tratadas con diferentes concentraciones de anti-CD20-hIFN α , rituximab, IFN α , rituximab+IFN α y un control de isotipo, resultando en una inhibición dosis-dependiente de la proliferación celular con anti-CD20-hIFN α a partir de la concentración de 5 μ g/mL en todas las líneas celulares pero que, comparada con la inhibición obtenida en las silvestres, es más marcada en las líneas celulares resistentes a rituximab, según la determinación del porcentaje de células recuperadas: 2F7, 70% vs 2F7R, 60% (Figura 7 A y B); Ramos, 85% vs RamosR, 66% (Figura 7 C y D). Con el resto de los tratamientos no se observó inhibición de la proliferación y la diferencia entre ellos no fue estadísticamente significativa.

La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α inhibe la viabilidad celular en líneas celulares de LNH resistentes a rituximab

Posteriormente, para determinar la viabilidad celular después del tratamiento con anti-CD20-hIFN α y los controles ya mencionados, se realizaron ensayos de tinción con azul de tripano. Se observó que el tratamiento de las células 2F7 con anti-CD20-hIFN α no mostró una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular con respecto al resto de los tratamientos (Figura 8 A). De manera similar, el tratamiento de las células 2F7R con la proteína de fusión no provocó disminución de la viabilidad celular a ninguna concentración; lo mismo sucedió con el resto de los tratamientos (Figura 8 B). Por otro lado, el tratamiento de las células RamosR con anti-CD20-hIFN α resultó en una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular a partir de la concentración de 10 μ g/mL en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 8 D), mientras que en las células Ramos silvestres no se observó disminución de la viabilidad celular a ninguna concentración con ningún tratamiento, incluyendo el de anti-CD20-hIFN α (Figura 8 C).

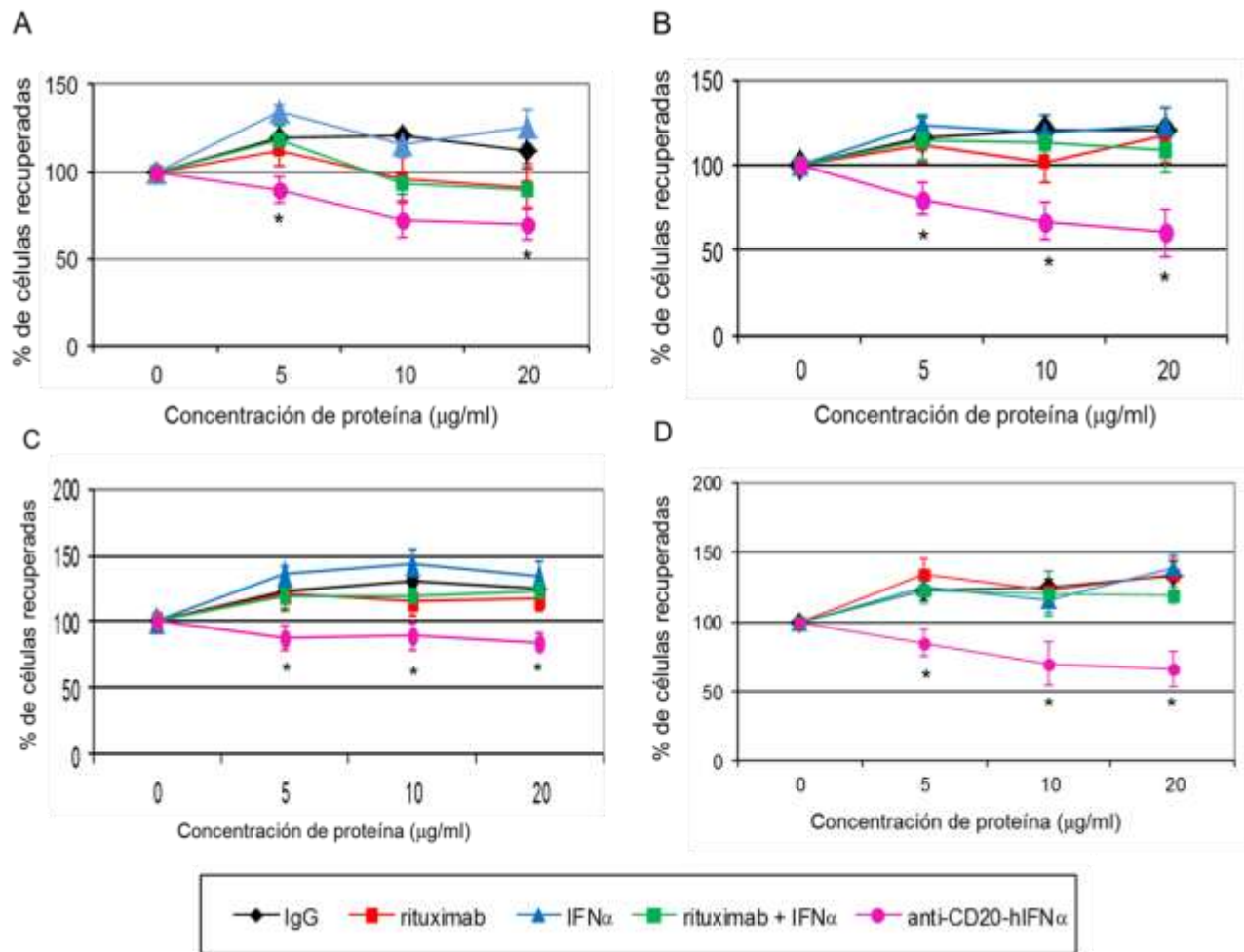
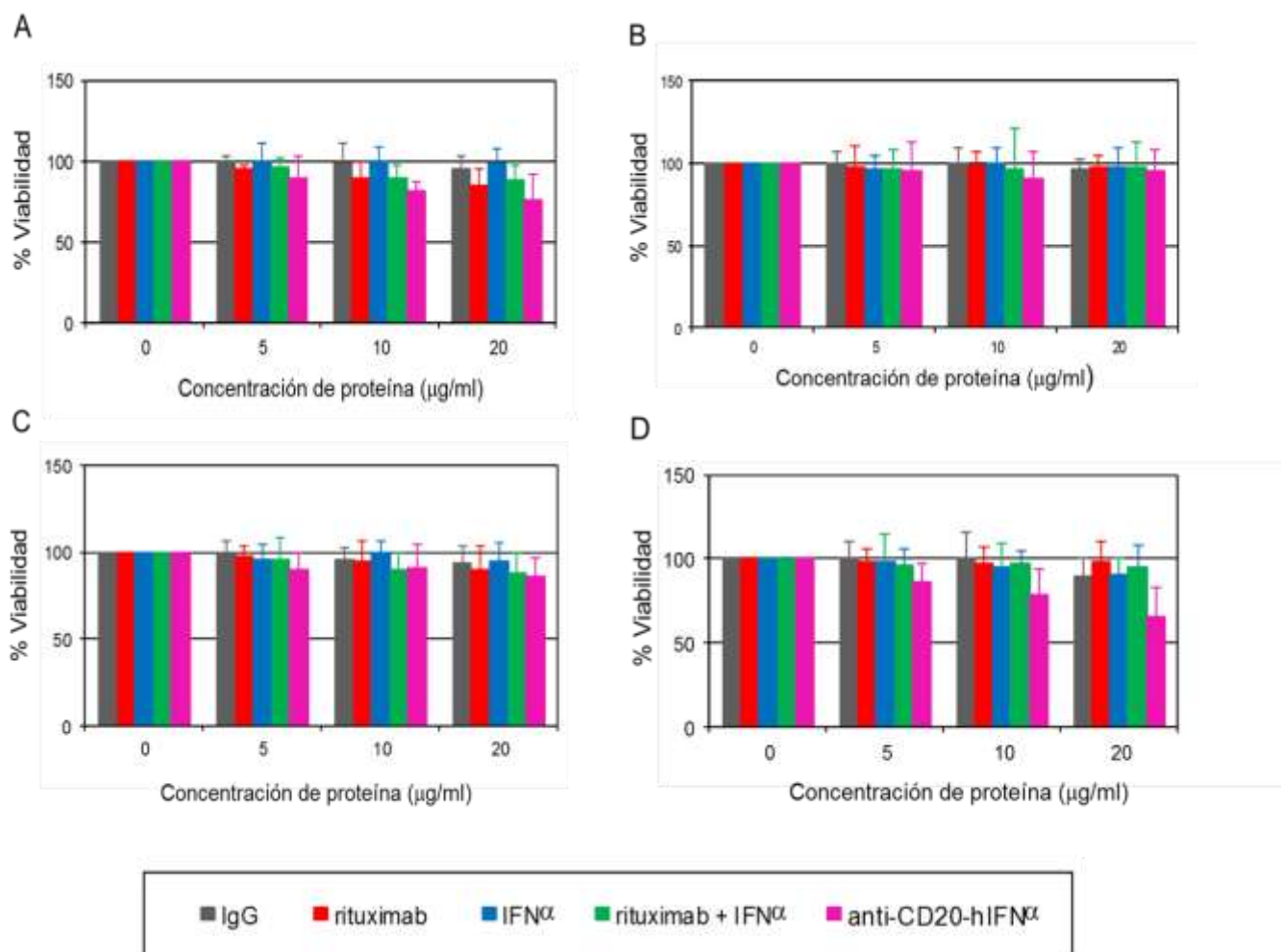


Figura 7. La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α inhibe la proliferación de líneas celulares de LNH. Todas las líneas celulares de LNH fueron tratadas con varias concentraciones de anti-CD20-hIFN α , con rituximab, con IFN α o con rituximab + IFN α . Además se realizó un control sin tratar y un control de isotipo (IgG). Mediante ensayos de proliferación celular con XTT se determinó el porcentaje de células recuperadas. La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α inhibe la proliferación de todas las líneas a partir de una concentración de 5 µg/mL, sin embargo en las células resistentes ésta inhibición es mayor. A, línea celular 2F7. B, línea celular 2F7R. C, línea celular Ramos. D, línea celular RamosR. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes.*P<0.05



El tratamiento de líneas celulares de LNH resistentes a rituximab con la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α induce apoptosis

Para saber si anti-CD20-hIFN α inducía apoptosis en líneas celulares de linfoma de células B, se determinó el porcentaje de caspasa-3 activa en las líneas celulares silvestres (2F7 y Ramos) y resistentes (2F7R y RR) tratadas con diferentes concentraciones de anti-CD20-IgG1-hIFN α , rituximab, IFN α , rituximab + IFN α y un control de isotipo mediante citometría de flujo. En las líneas celulares 2F7 y Ramos la proteína de fusión (anti-CD20-hIFN α) no indujo significativamente más apoptosis que el resto de los tratamientos, incluyendo el control de isotipo (Figura 9 A y C). Sin embargo, en la línea celular 2F7R la proteína de fusión (anti-CD20-hIFN α) indujo, en todas las concentraciones, significativamente mayor apoptosis que los demás tratamientos (Figura 9 B). En contraste, en las células RamosR la proteína de fusión (anti-CD20-hIFN α) indujo un porcentaje de apoptosis muy similar al inducido por el tratamiento de rituximab + IFN α y no significativamente mayor al inducido por IFN α , pero si es significativamente mayor al inducido por el control de isotipo y por rituximab (Figura 9 D).

La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α induce quimiosensibilidad en líneas celulares de LNH resistentes a rituximab

Se sabe que el tratamiento con rituximab quimiosensibiliza a líneas celulares de LNH y esto se ve reflejado en el mejor efecto que ofrece el tratamiento de pacientes con LNH con la combinación R-CHOP. Sin embargo, existen pacientes que se vuelven refractarios a esta terapia combinada. Por ello es importante saber si anti-CD20-hIFN α es capaz de quimiosensibilizar a líneas celulares resistentes a rituximab. Para esto, mediante citometría de flujo, en las mismas líneas celulares se probó la sensibilización a apoptosis mediada por anti-CD20-hIFN α después de añadir CDDP, para lo cual además de los tratamientos con anti-CD20-hIFN α , rituximab, rituximab + IFN α y el control de isotipo también se realizaron los

siguientes tratamientos: anti-CD20-hIFN α + CDDP, rituximab + CDDP, rituximab + IFN α + CDDP e IgG +CDDP. Tanto en las células 2F7 como en las células 2F7R, el tratamiento con anti-CD20-hIFN α + CDDP indujo mayor apoptosis que el resto de los tratamientos (Figura 10 A y B), sin embargo esta diferencia es más marcada y estadísticamente significativa con respecto a los otros tratamientos, a todas las concentraciones, en las células 2F7R (Figura 10 B). En cuanto a la línea celular Ramos, el tratamiento con anti-CD20-hIFN α + CDDP indujo mayor apoptosis que el resto de los tratamientos excepto el de rituximab + CDDP (Figura 10 C), pero en las células RamosR el tratamiento con anti-CD20-hIFN α + CDDP indujo significativamente más apoptosis en comparación con la apoptosis inducida por el resto de los tratamientos (Figura 10 D).

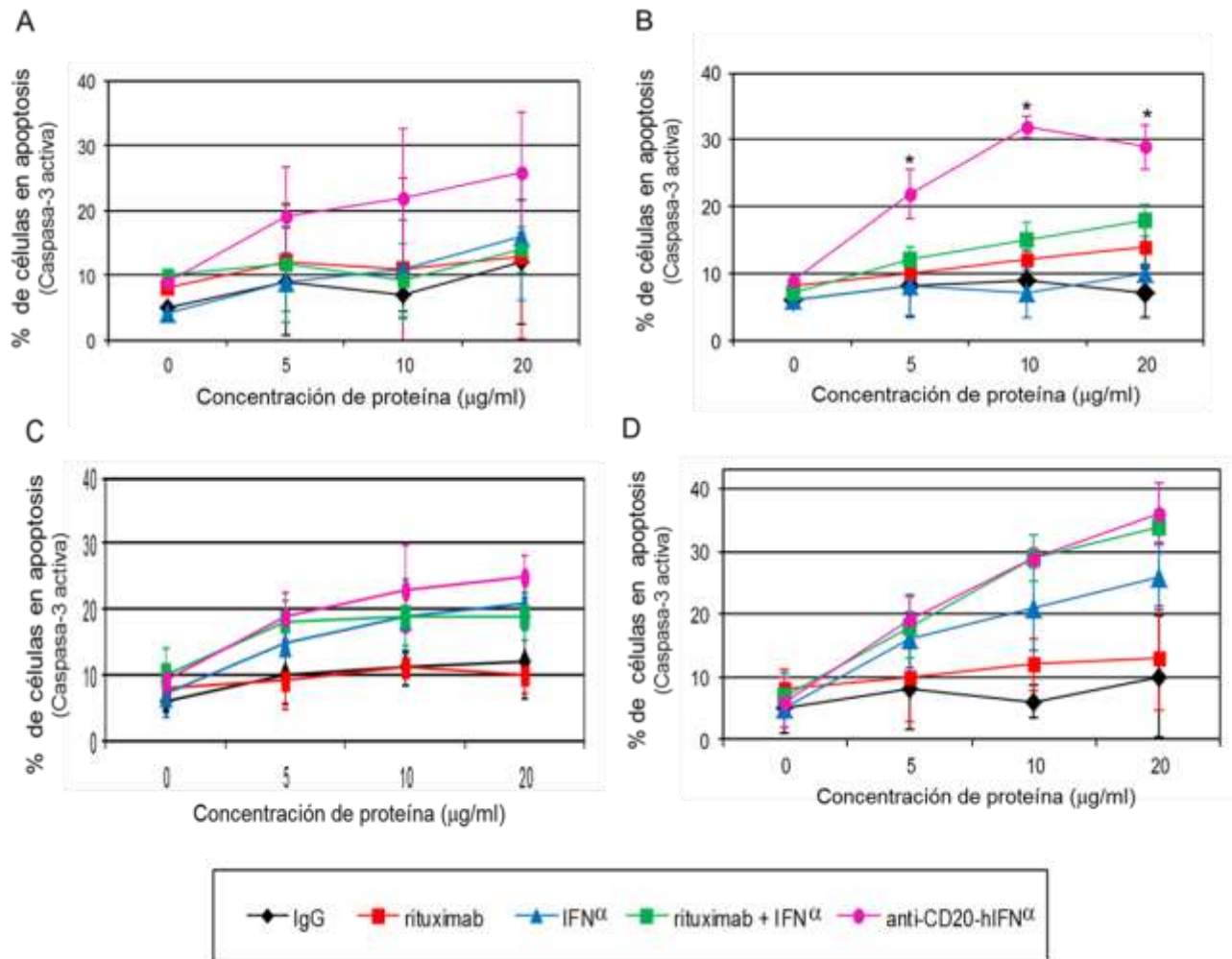


Figura 9. La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α induce apoptosis en la línea celular 2F7 resistente a rituximab. Todas las líneas celulares de LNH fueron tratadas con varias concentraciones de la anti-CD20-hIFN α , de rituximab, de IFN α o de rituximab + IFN α . Además se realizó un control sin tratar y un control de isotipo (IgG). Mediante citometría de flujo se determinó el porcentaje de células en apoptosis usando caspasa-3 activa como marcador. El tratamiento de las células 2F7R con anti-CD20-hIFN α indujo un porcentaje de apoptosis significativamente mayor al inducido por los controles (10 μ g/mL; anti-CD20-hIFN α 32%, Controles <20%) a partir de 5 μ g/mL A, línea celular 2F7. B, línea celular 2F7R. C, línea celular Ramos. D, línea celular RamosR. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. *P<0.05

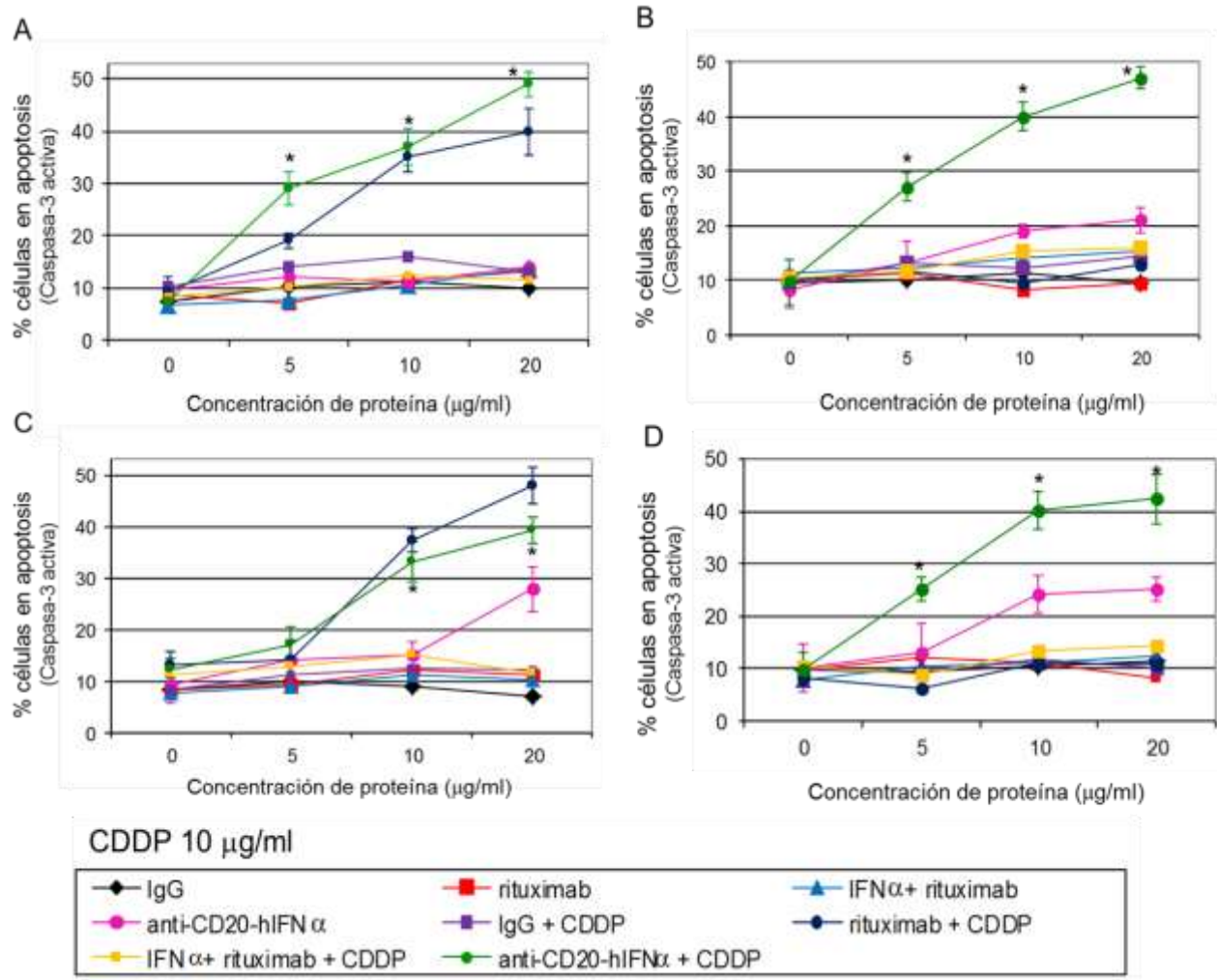


Figura 10. La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α quimiosensibiliza a las líneas celulares resistentes a rituximab. Todas las líneas celulares de LNH fueron tratadas con varias concentraciones de anti-CD20-hIFN α , rituximab, IFN α , rituximab + IFN α y un control de isotipo (IgG). Además se realizaron tratamientos en los que después de incubar por 24h con rituximab, rituximab + IFN α , anti-CD20-hIFN α y control de isotipo, se trataron 18h más con CDDP 10 µg/mL (rituximab + CDDP, IFN α + rituximab +CDDP, anti-CD20-hIFN α +CDDP e IgG+CDDP, respectivamente). También se realizaron controles sin tratar. Mediante citometría de flujo se determinó el porcentaje de células en apoptosis usando caspasa-3 activa como marcador. La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α indujo significativamente mayor apoptosis en las células 2F7R y RamosR que los controles. (10 µg/mL, anti-CD20-hIFN α : 40% vs Controles<20% y anti-CD20-hIFN α : 40% vs Controles<25%, respectivamente). A, línea celular 2F7. B, línea celular 2F7R. C, línea celular Ramos. D, línea celular RamosR. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes*P<0.05

El efecto de quimiosensibilidad en líneas celulares de LNH resistentes a rituximab de la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α es independiente del tiempo de tratamiento

Debido a que se observó mayor efecto de anti-CD20-hIFN α a 20 μ g/ml, se eligió dicha concentración para realizar una cinética de apoptosis a 24, 48 y 72 h en las líneas celulares silvestres y resistentes a rituximab, pues era de interés saber si el efecto de anti-CD20-hIFN α variaba con respecto al tiempo de tratamiento. Se observó que no hay diferencia en la sensibilización a apoptosis mediada por anti-CD20-hIFN α a través del tiempo en las células 2F7 y 2F7R (Figura 11 A y B, respectivamente) ni en las células Ramos y RamosR (Figura 11 C y D). Además se corroboraron los resultados de apoptosis obtenidos (Figura 10) en todas las líneas celulares.

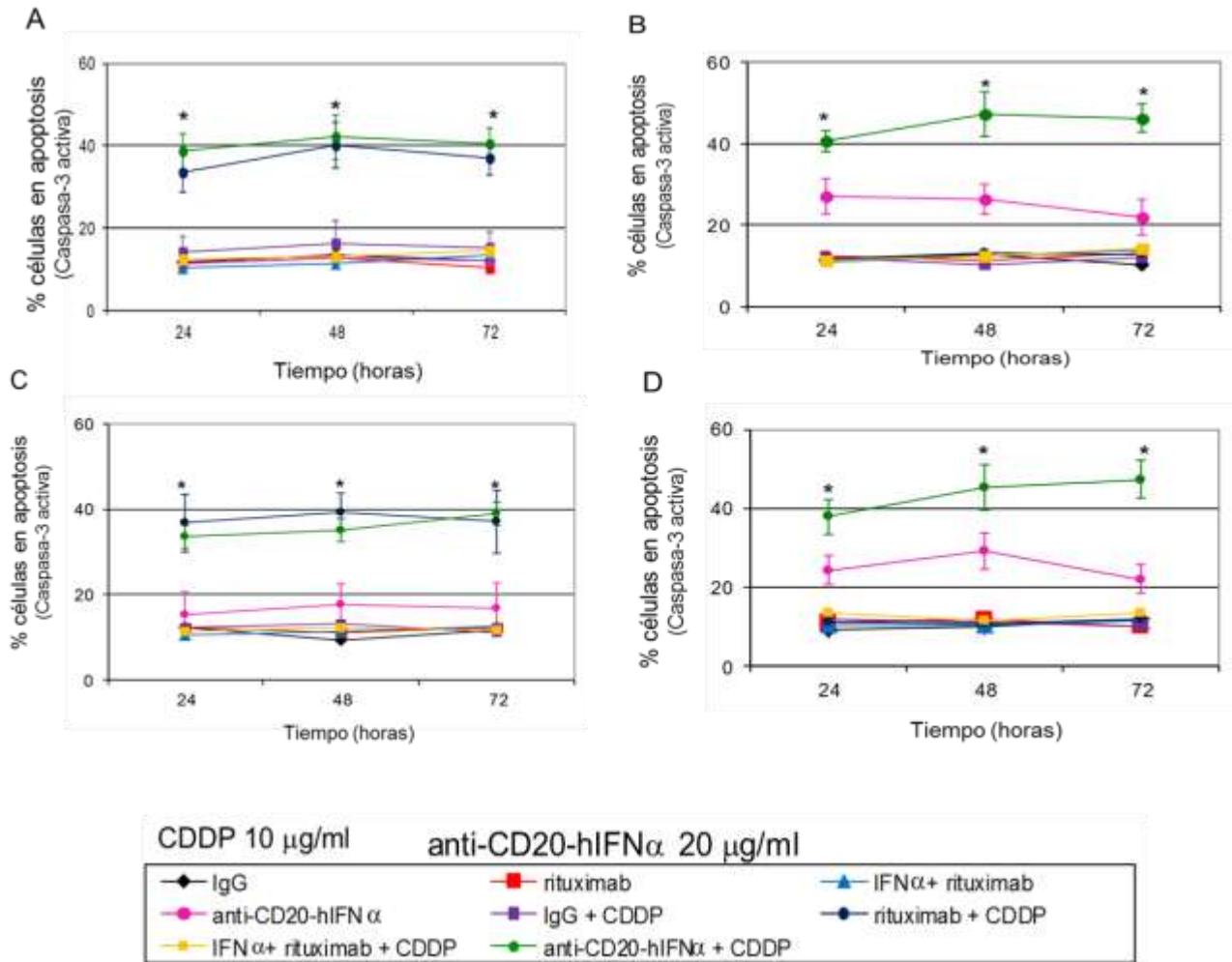


Figura 11. La quimiosensibilización mediada por la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α no es dependiente del tiempo. Todas las líneas celulares de LNH fueron tratadas durante 24, 48 y 72 h con varias concentraciones de anti-CD20-hIFN α , rituximab, IFN α , rituximab +IFN α o un control de isotipo (IgG). Además se realizaron tratamientos en los que después de incubar por 24 h con rituximab, rituximab + IFN α , anti-CD20-hIFN α y el control de isotipo, se trataron 18 h más con CDDP 10 µg/mL (rituximab + CDDP, IFN α + rituximab +CDDP, anti-CD20-hIFN α + CDDP e IgG + CDDP, respectivamente). También se realizaron controles sin tratar. Mediante citometría de flujo se determinó el porcentaje de células en apoptosis, usando como marcador caspasa-3 activa A, línea celular 2F7 B, línea celular 2F7R C, línea celular Ramos D, línea celular RamosR. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. *P<0.05

La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α es capaz de inhibir la señalización de CD20 mediante la vía de NF- κ B y la de IFNAR mediante la vía de PKC δ en líneas celulares de LNH resistentes a rituximab

Para tratar de determinar el mecanismo mediante el cual anti-CD20-hIFN α quimiosensibiliza a las líneas celulares de LNH de células B resistentes a rituximab, en las células RamosR se examinó mediante Western blot la expresión de algunas proteínas implicadas en la quimiosensibilidad mediada por rituximab, como fosfo-p38 y Bcl-xL, NF- κ B y de otras que participan en la apoptosis mediada por IFN α en linfoma Burkitt, como Bcl-6, fosfo-PKC δ , fosfo-STAT1 y fosfo-JNK.

En cuanto a las proteínas implicadas en la quimiosensibilidad mediada por rituximab, el tratamiento de las células Ramos con rituximab y con anti-CD20-hIFN α muestra una notable disminución en la expresión de fosfo-p38 en ambos casos y en una disminución en la expresión de Bcl-xL que fue mayor con el tratamiento de anti-CD20-hIFN α , con respecto al control (Figura 12 A). En cambio, en las células RamosR la expresión de fosfo-p38 y Bcl-xL sólo se ve disminuida con el tratamiento de anti-CD20-hIFN α (Figura 12 B). Cuando analizamos la expresión de NF- κ B (p65) se observa claramente que en las células Ramos tanto rituximab como anti-CD20-hIFN α inhiben la expresión de fosfo-p65, siendo esta inhibición mayor con anti-CD20-hIFN α (Figura 12 A), pero en las células RamosR sólo anti-CD20-hIFN α es capaz de inhibir la fosforilación de p65 (Figura 12 B). Por otro lado, se determinó la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax, la cual no muestra cambios en las células Ramos tratadas con rituximab o anti-CD20-hIFN α . Sin embargo, en las células RamosR tratadas con anti-CD20-hIFN α se observa un incremento en la expresión de Bax (Figura 12 B). Al analizar la vía del receptor de IFN α interesantemente se observa un incremento en la expresión de Bcl-6, fosfo-STAT1 y fosfo-PKC δ en las células Ramos tratadas con anti-CD20-hIFN α , mientras que sólo al tratarlas con rituximab se ve un ligero incremento en la activación de JNK (Figura 12 C). Por otro lado, en la línea celular RamosR,

cuando es tratada con anti-CD20-hIFN α , se observa un ligero aumento en la expresión de Bcl-6 pero la activación de PKC δ , STAT1 y JNK se ve disminuida con respecto al control, mientras que al tratar estas células RamosR con rituximab no se observan cambios en la expresión de estas proteínas excepto un ligero aumento en la activación de PKC δ , STAT1 (Figura 12 D).

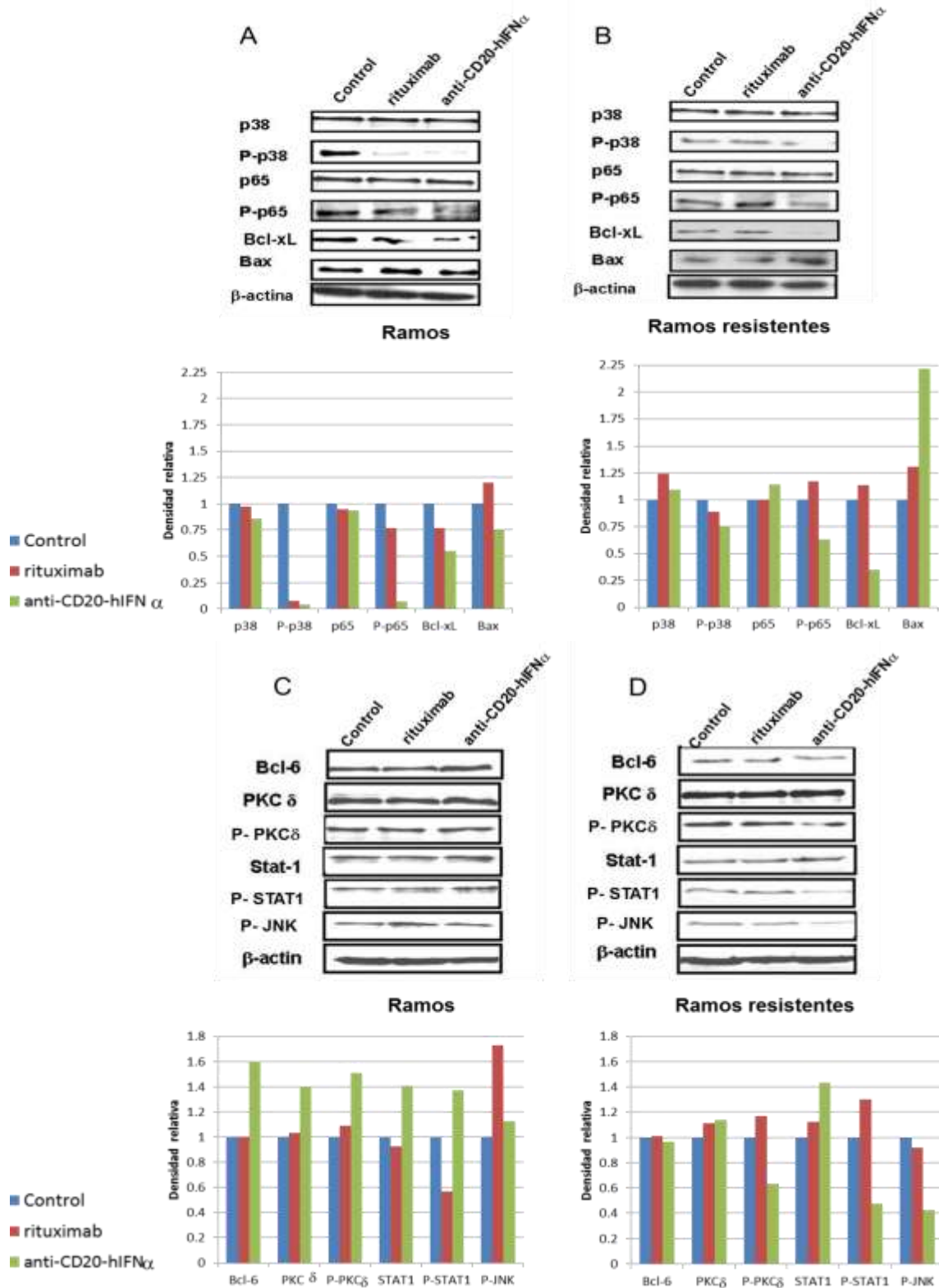


Figura 12. La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α inhibe la expresión de NF- κ B y la vía de PKC δ y STAT1. Extractos totales de células Ramos y RamosR tratadas por 24 h con rituximab o la proteína de fusión fueron analizados por Western blot. También se realizó un control sin tratar A) Análisis de la vía de CD20 en células Ramos o B) RamosR, donde se observa que en estas últimas la proteína de fusión inhibe la vía. C) Análisis de la vía del receptor de IFN α en células Ramos o D) RamosR donde se observa una clara inhibición de PKC δ y STAT1. El análisis densitométrico correspondiente se observa debajo de cada panel de bandas.

DISCUSIÓN

El anticuerpo quimérico monoclonal rituximab (anti-CD20) es parte de las terapias estándar utilizadas para el tratamiento de pacientes con linfoma no-Hodgkin de células B, en combinación con quimioterapia (R-CHOP) ⁷⁸. Sin embargo algunos pacientes no responden o adquieren resistencia a rituximab con tratamientos subsecuentes ⁷⁹. Recientemente se desarrolló la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α con el objetivo de dirigir IFN α a las células tumorales de LNH ⁷⁶, sin embargo en este estudio se analizaron los efectos de anti-CD20-hIFN α en dos líneas celulares resistentes a rituximab 2F7R y RamosR, pues debido a la naturaleza dual de esta proteína podría tener efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos en estas líneas celulares. Los resultados muestran que anti-CD20-hIFN α inhibe la proliferación tanto en las células resistentes como en las silvestres (Figura 7), disminuye la viabilidad de las células RamosR (Figura 8 D) e induce apoptosis en las células 2F7R (Figura 9 B), de manera significativa con respecto al tratamiento con rituximab, IFN α y la combinación de rituximab con IFN α . Estos resultados demuestran que anti-CD20-hIFN α tiene efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos *in vitro* más potentes que rituximab e IFN α . Asimismo nuestros hallazgos indican que para observar dichos efectos es indispensable el tratamiento con anti-CD20-hIFN α . Además se determinó que anti-CD20-hIFN α quimiosensibiliza a las células 2F7R y RamosR induciendo aproximadamente el doble de apoptosis que rituximab e IFN α + rituximab (Figuras 10 B y D).

Por todo lo anterior, anti-CD20-hIFN α tiene un gran potencial como alternativa terapéutica para LNH resistentes a rituximab y es de interés determinar el mecanismo por el cual causa apoptosis y quimiosensibilidad. Por su naturaleza parecía probable que el mecanismo de señalización de esta proteína implicara la señalización de CD20 y del receptor tipo 1 de IFN, por lo que en este estudio se analizó la expresión y activación de proteínas involucradas en las vías de señalización de CD20 y el receptor tipo 1 de INF. Recientemente se ha reportado que el IFN α es capaz de inducir apoptosis en líneas celulares de LNH por la disminución en la expresión de la proteína Bcl-6 ⁷³. Sin embargo, nuestros

resultados no muestran una importante disminución de esta proteína en las células RamosR y en las células Ramos se ve un aumento. En esta misma vía de señalización mediada por la vía del receptor tipo 1 de INF encontramos que anti-CD20-hIFN α incrementa la expresión y activación de PKC δ , STAT1 y JNK en las células Ramos. Sin embargo induce una inhibición en las células RamosR, lo que está en contradicción con lo previamente reportado por Yanase y Col. ⁷², quienes demuestran que el IFN α es capaz de inducir apoptosis mediada por TRAIL, mediante la activación de la vía de PKC δ y la activación de la STAT1 y JNK. Al parecer, en nuestro modelo esta vía que es constitutivamente activa en las células Ramos y RamosR, sólo se ve inhibida por anti-CD20-hIFN α en las células RamosR como una posible vía de acción que entrecruce con la vía de CD20, ya que como se observa en los resultados anti-CD20-hIFN α es capaz de inhibir la vía de p38MAPK. O bien podría ser una consecuencia de la ligera inhibición de Bcl-6, ya que este correlaciona con la inhibición de PKC δ , STAT1 y JNK. El tratamiento de las células RamosR con anti-CD20-hIFN α induce disminución de Bcl-xL e inducción de Bax, lo cual podría ocurrir a través de la vía de AKT, ERK1/2 o NF κ B, cuya activación está disminuida en nuestros estudios en RamosR, mediante la señalización de CD20. Esto apoya la idea de una posible vía de señalización que muestre entrecruzamiento entre la vía CD20 y el receptor de IFN α . Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales con inhibidores de la vía del receptor de IFN α y de la vía de CD20 para evaluar su participación en la inducción de apoptosis en las líneas celulares resistentes a rituximab, así como valorar las vías de apoptosis para determinar cuál de ellas es la vía efectora activada por anti-CD20-hIFN α en estas células. Por otro lado también es importante evaluar la efectividad de anti-CD20-hIFN α *in vivo* en modelos murinos de xenotrasplante con estas líneas celulares resistentes a rituximab.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que en las líneas celulares de LNH resistentes a rituximab:

-La proteína de fusión anti-CD20-IFN α provoca una importante inhibición de la proliferación

-La proteína de fusión anti-CD20-IFN α es capaz de inducir apoptosis de manera directa

-La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α es capaz de inducir quimiosensibilidad.

-La quimiosensibilidad provocada por la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α parece estar asociada a la inhibición de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-xL e inducción de proteínas pro-apoptóticas como Bax.

-La proteína de fusión anti-CD20-hIFN α inhibe tanto la señalización de CD20 mediante la vía de NF- κ B como la señalización de IFNAR mediante la vía de PKC δ .

-La inhibición de la vía de NF- κ B provocada por la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α apoya la idea del entrecruzamiento de las vías de CD20 e IFNAR.

-La inhibición de p38 provocada por la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α podría ser la vía de acción mediante la cual se entrecrucen las vías de CD20 e IFNAR.

PERSPECTIVAS

-Estudios *in vitro*

Análisis por Western blot incluyendo como controles rituximab + IFN α e IFN α , y determinar la expresión de otras proteínas involucradas en las vías.

Evaluar la quimiosensibilidad inducida por la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α utilizando otros fármacos.

Valoración de las vías de apoptosis para determinar la vía efectora de la proteína de fusión anti-CD20-hIFN α .

Determinar la posible vía de entrecruzamiento utilizando inhibidores químicos de las vías de IFN α y de CD20.

-Estudios *in vivo*

Evaluar la efectividad de anti-CD20-hIFN α en modelos murinos de xenotrasplante utilizando líneas celulares resistentes a rituximab.

REFERENCIAS

1. GLOBOCAN 2011. WHO . 2013.
Ref Type: Electronic Citation
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2):69-90.
3. INEGI Consulta interactiva de datos. Registros administrativos. Estadísticas de mortalidad general 2011. INEGI . 2013.
Ref Type: Electronic Citation
4. American Cancer Society. American Cancer Society . 2013.
Ref Type: Electronic Citation
5. World Health Organization. Global burden of disease. WHO . 2013.
Ref Type: Electronic Citation
6. Lyons SF, Liebowitz DN. The roles of human viruses in the pathogenesis of lymphoma. *Semin Oncol* 1998; 25(4):461-475.
7. Danby CS, Allen L, Moharir MD, Weitzman S, Dumont T. Non-Hodgkin B-cell lymphoma of the ovary in a child with ataxia-telangiectasia. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2013.
8. Du S, Scuderi R, Malicki DM, Willert J, Bastian J, Weidner N. Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas occurring in two brothers with Wiskott-Aldrich syndrome and review of the literature. *Pediatr Dev Pathol* 2011; 14(1):64-70.
9. Ganzel C, Rowe JM, Ruchlemer R. Primary effusion lymphoma in a HIV-negative patient associated with hypogammaglobulinemia. *Am J Hematol* 2011; 86(9):777-781.
10. Pronk A, Nuckols JR, De Roos AJ et al. Residential proximity to industrial combustion facilities and risk of non-Hodgkin lymphoma: a case-control study. *Environ Health* 2013; 12:20.
11. Percy C, O'Connor G, Ries LG, Jaffe ES. Non-Hodgkin's lymphomas. Application of the international classification of diseases for oncology (ICD-O) to the Working Formulation. *Cancer* 1984; 54(7):1435-1438.
12. Gupta S, Gupta R, Singh S, Gupta K, Kudesia M. Nuclear morphometry and texture analysis of B-cell non-Hodgkin lymphoma: utility in subclassification on cytospins. *Diagn Cytopathol* 2010; 38(2):94-103.

13. Chamrathy MR, Williams SC, Moadel RM. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma: from the 'magic bullets' to 'radioactive magic bullets'. *Yale J Biol Med* 2011; 84(4):391-407.
14. Mueller N, Mohar A, Evans A et al. Epstein-Barr virus antibody patterns preceding the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 1991; 49(3):387-393.
15. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 229(4720):1390-1393.
16. Ohno H, Ueda C, Akasaka T. The t(9;14)(p13;q32) translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2000; 36(5-6):435-445.
17. Pileri SA, Falini B. Mantle cell lymphoma. *Haematologica* 2009; 94(11):1488-1492.
18. Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 2004; 22(17):3498-3506.
19. Engels EA. Infectious agents as causes of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(3):401-404.
20. Engels EA, Goedert JJ. Human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome and cancer: past, present, and future. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(6):407-409.
21. Jaffe ES. Hematopathology: integration of morphologic features and biologic markers for diagnosis. *Mod Pathol* 1999; 12(2):109-115.
22. Mac MM. Conformal radiotherapy and molecular imaging: complementary technologies in cancer therapy. *Biomed Imaging Interv J* 2006; 2(1):e2.
23. Hagenbeek A, Eghbali H, Monfardini S et al. Phase III intergroup study of fludarabine phosphate compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone chemotherapy in newly diagnosed patients with stage III and IV low-grade malignant Non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(10):1590-1596.
24. Saven A, Emanuele S, Kosty M, Koziol J, Ellison D, Piro L. 2-Chlorodeoxyadenosine activity in patients with untreated, indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1995; 86(5):1710-1716.
25. Persky DO, Unger JM, Spier CM et al. Phase II study of rituximab plus three cycles of CHOP and involved-field radiotherapy for patients with limited-

stage aggressive B-cell lymphoma: Southwest Oncology Group study 0014. *J Clin Oncol* 2008; 26(14):2258-2263.

26. Coiffier B, Lepage E, Briere J et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346(4):235-242.
27. Belic A, Popovic S, Savic I. Effect of polychemotherapy in the treatment of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Med Pregl* 1992; 45(5-6):188-193.
28. Grillo-Lopez AJ, White CA, Varns C et al. Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Semin Oncol* 1999; 26(5 Suppl 14):66-73.
29. Boye J, Elter T, Engert A. An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Ann Oncol* 2003; 14(4):520-535.
30. Kosmas C, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, Tsavaris N, Papadaki T. Anti-CD20-based therapy of B cell lymphoma: state of the art. *Leukemia* 2002; 16(10):2004-2015.
31. Byrd JC, Waselenko JK, Maneatis TJ et al. Rituximab therapy in hematologic malignancy patients with circulating blood tumor cells: association with increased infusion-related side effects and rapid blood tumor clearance. *J Clin Oncol* 1999; 17(3):791-795.
32. Coiffier B. Which treatment for mantle-cell lymphoma patients in 1998? *J Clin Oncol* 1998; 16(1):3-5.
33. Quartier P. Emergencies in pediatric rheumatology. *Arch Pediatr* 2001; 8 Suppl 2:230s-232s.
34. Zecca M, De Stefano P, Nobili B, Locatelli F. Anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of severe, immune-mediated, pure red cell aplasia and hemolytic anemia. *Blood* 2001; 97(12):3995-3997.
35. Shaw T, Quan J, Totoritis MC. B cell therapy for rheumatoid arthritis: the rituximab (anti-CD20) experience. *Ann Rheum Dis* 2003; 62 Suppl 2:ii55-ii59.
36. Cohen Y, Polliack A, Zelig O, Goldfarb A. Monotherapy with rituximab induces rapid remission of recurrent cold agglutinin-mediated hemolytic anemia in a patient with indolent lympho-plasmacytic lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001; 42(6):1405-1408.
37. Eisenberg R. SLE - Rituximab in lupus. *Arthritis Res Ther* 2003; 5(4):157-159.

38. Ansell SM, Witzig TE, Kurtin PJ et al. Phase 1 study of interleukin-12 in combination with rituximab in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99(1):67-74.
39. Gluck WL, Hurst D, Yuen A et al. Phase I studies of interleukin (IL)-2 and rituximab in B-cell non-hodgkin's lymphoma: IL-2 mediated natural killer cell expansion correlations with clinical response. *Clin Cancer Res* 2004; 10(7):2253-2264.
40. Micallef IN, Maurer MJ, Wiseman GA et al. Epratuzumab with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy in patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2011; 118(15):4053-4061.
41. Betting DJ, Hurvitz SA, Steward KK et al. Combination of cyclophosphamide, rituximab, and intratumoral CpG oligodeoxynucleotide successfully eradicates established B cell lymphoma. *J Immunother* 2012; 35(7):534-543.
42. Davis TA, Maloney DG, Grillo-Lopez AJ et al. Combination immunotherapy of relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma with rituximab and interferon-alpha-2a. *Clin Cancer Res* 2000; 6(7):2644-2652.
43. Kimby E, Jurlander J, Geisler C et al. Long-term molecular remissions in patients with indolent lymphoma treated with rituximab as a single agent or in combination with interferon alpha-2a: a randomized phase II study from the Nordic Lymphoma Group. *Leuk Lymphoma* 2008; 49(1):102-112.
44. Borden EC, Sen GC, Uze G et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(12):975-990.
45. Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 2010; 207(10):2053-2063.
46. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 1998; 91(5):1644-1652.
47. Deans JP, Kalt L, Ledbetter JA, Schieven GL, Bolen JB, Johnson P. Association of 75/80-kDa phosphoproteins and the tyrosine kinases Lyn, Fyn, and Lck with the B cell molecule CD20. Evidence against involvement of the cytoplasmic regions of CD20. *J Biol Chem* 1995; 270(38):22632-22638.
48. Cragg MS, Morgan SM, Chan HT et al. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 2003; 101(3):1045-1052.

49. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 2003; 22(47):7359-7368.
50. Pedersen IM, Buhl AM, Klausen P, Geisler CH, Jurlander J. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood* 2002; 99(4):1314-1319.
51. Hofmeister JK, Cooney D, Coggeshall KM. Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26(2):133-143.
52. Mathas S, Rickers A, Bommert K, Dörken B, Mapara MY. Anti-CD20 and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular pathways. *Cancer Res* 2000; 60(24):7170-7176.
53. Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES. Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood* 2001; 97(5):1392-1398.
54. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 48(12):673-683.
55. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW et al. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood* 2002; 99(3):1038-1043.
56. Alas S, Bonavida B. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Res* 2001; 61(13):5137-5144.
57. Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res* 2001; 7(3):709-723.
58. Vega MI, Huerta-Yepaz S, Garban H, Jazirehi A, Emmanouilides C, Bonavida B. Rituximab inhibits p38 MAPK activity in 2F7 B NHL and decreases IL-10 transcription: pivotal role of p38 MAPK in drug resistance. *Oncogene* 2004; 23(20):3530-3540.
59. Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immuno-resistance, rituximab

unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene* 2007; 26(25):3629-3636.

60. Jazirehi AR, Vega MI, Chatterjee D, Goodglick L, Bonavida B. Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by rituximab. *Cancer Res* 2004; 64(19):7117-7126.
61. Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS et al. Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 2001; 21(21):7207-7217.
62. Suzuki E, Umezawa K, Bonavida B. Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene* 2007; 26(42):6184-6193.
63. Garban HJ, Bonavida B. Nitric oxide inhibits the transcription repressor Yin-Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: a pivotal role for nitric oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells. *J Immunol* 2001; 167(1):75-81.
64. Huerta-Yepez S, Vega M, Jazirehi A et al. Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF-kappa B and inhibition of Bcl-xl expression. *Oncogene* 2004; 23(29):4993-5003.
65. Vega MI, Huerta-Yepez S, Jazirehi AR, Garban H, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20) sensitizes B-NHL cell lines to Fas-induced apoptosis. *Oncogene* 2005; 24(55):8114-8127.
66. de Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem* 2007; 282(28):20053-20057.
67. Liu ML, Lee YP, Wang YF et al. Type I interferons protect mice against enterovirus 71 infection. *J Gen Virol* 2005; 86(Pt 12):3263-3269.
68. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist* 2001; 6(1):34-55.
69. Vilcek J. Novel interferons. *Nat Immunol* 2003; 4(1):8-9.
70. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(5):375-386.

71. Smalley RV, Andersen JW, Hawkins MJ et al. Interferon alfa combined with cytotoxic chemotherapy for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1992; 327(19):1336-1341.
72. Yanase N, Hayashida M, Kanetaka-Naka Y, Hoshika A, Mizuguchi J. PKC-delta mediates interferon-alpha-induced apoptosis through c-Jun NH(2)-terminal kinase activation. *BMC Cell Biol* 2012; 13:7.
73. Salamon D, Adori M, He M et al. Type I interferons directly down-regulate BCL-6 in primary and transformed germinal center B cells: differential regulation in B cell lines derived from endemic or sporadic Burkitt's lymphoma. *Cytokine* 2012; 57(3):360-371.
74. Basso K, Saito M, Sumazin P et al. Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* 2010; 115(5):975-984.
75. Brin E, Atencio I, Helmich BK, Maneval D, Laface D. Adenovirus delivery provides extended interferon-alpha exposure and augments treatment of metastatic carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2006; 13(7):664-675.
76. Xuan C, Steward KK, Timmerman JM, Morrison SL. Targeted delivery of interferon-alpha via fusion to anti-CD20 results in potent antitumor activity against B-cell lymphoma. *Blood* 2010; 115(14):2864-2871.
77. Jazirehi AR, Vega MI, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signalling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res* 2007; 67(3):1270-1281
78. Nastoupil LJ, Rose AC, Flowers CR. Diffuse large B-cell lymphoma: current treatment approaches. *Oncology (Williston Park)* 2012; 26(5):488-495.
79. Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 2007; 26(25):3603-3613.