

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. HIPOTESIS

Dada la importancia que los STAT tiene en la transmisión de señales por citocinas, podemos suponer que la ausencia de dichos factores de transcripción, como consecuencia del tratamiento con distintas drogas, como fludarabina y los inhibidores de JAK kinasas, puede tener consecuencias importantes en los fenómenos de regulación de la respuesta inmune y en la propia fisiología de la LLC-B, favoreciendo o dificultando la entrada en apoptosis de la misma. Por tanto, resulta prioritario el desarrollo de estudios con el fin de conocer la implicación que la vía JAK/STAT tiene en el desarrollo de la LLC-B para poder predecir la conveniencia o no de la utilización de diversas drogas en el tratamiento de este determinado tipo de leucemia.

2. OBJETIVOS CONCRETOS

1. Analizar el efecto de fludarabina y de los inhibidores de JAK kinasas sobre los componentes de la vía JAK/STAT en las células tumorales de sangre periférica de pacientes con LLC-B.
2. Analizar el efecto de fludarabina y de los inhibidores de JAK kinasas sobre la viabilidad de las células tumorales de sangre periférica de pacientes con LLC-B.
3. Establecer la correlación entre los efectos de fludarabina y de los inhibidores de JAK kinasas sobre los componentes de la vía JAK/STAT y la entrada en apoptosis de las células tumorales de pacientes con LLC-B.
4. Analizar el papel de fludarabina en la interacción entre las células tumorales de LLC-B y las células NLC.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

1. PACIENTES Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

En el estudio se incluyen 34 pacientes diagnosticados de Leucemia Linfocítica Crónica de células B (LLC-B), que cumplen los criterios internacionales establecidos de los que se han analizado un total de 38 muestras. En la Tabla M1. se resume las características epidemiológicas, estadio y hallazgos de laboratorio de todos los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla M1. Características clínicas y de laboratorio de los pacientes con LLC-B incluidos en el estudio.

Id	Edad / Sexo	Tiempo Evolución	Clasificación Rai / Binet	Leucocitos ($\times 10^9/l$)	Linfocitos (%)	Linfocitos ($\times 10^9/l$)	Tratamiento Previo ^b
LLC 1	72 / H	2	0 / A	8,96	57,9	5,19	N
LLC 6	54 / M	3	II / A	14,15	79,7	11,28	CLB / F / MTX
LLC 7	72 / H	6	II / A	16,41	65,1	10,68	CLB / F / CFM
LLC 11	71 / M	3	0 / A	31,92	74,0	23,62	N
LLC 13 ^a	75 / H	3	II / A	73,33	88,0	64,53	N
LLC 14 ^a	91 / M	7	I / A	7,45	54,9	4,09	CLB
LLC 15	71 / H	2	0 / A	14,69	72,6	10,66	N
LLC 17	53 / M	5	0 / A	13,92	51,7	7,20	N
LLC 19	80 / H	2	0 / A	10,35	66,9	6,92	N
LLC 20	71 / H	7	0 / A	12,25	67,8	8,31	N
LLC 22	53 / H	11	I / B	25,08	93,0	23,32	CLB / F / TPH
LLC 26	62 / H	5	0 / A	27,99	85,4	23,90	N
LLC 27 ^a	45 / M	7	0 / A	33,92	83,0	28,15	N
LLC 30	67 / H	7	0 / A	11,78	57,1	6,73	CLB
LLC 31	61 / H	3	II / A	84,11	92,0	77,38	N
LLC 32	44 / H	1	0 / A	10,48	59,3	6,21	N
LLC 33	90 / M	14	0 / A	27,04	84,4	22,82	N
LLC 34	71 / H	1	II / A	20,36	79,0	16,08	N
LLC 36	75 / H	2	0 / A	18,47	73,4	13,55	N
LLC 38	63 / H	5	0 / A	32,05	85,1	27,27	N
LLC 39	78 / H	2	0 / A	25,83	61,6	15,91	N
LLC 40	86 / H	2	0 / A	38,40	74,0	28,42	N
LLC 41	78 / M	4	IV / C	6,19	92,0	5,69	CLB / F
LLC 42 ^a	71 / H	3	0 / A	45,42	85,0	38,61	CLB
LLC 43	79 / M	3	0 / A	32,60	83,0	37,06	N
LLC 45	88 / H	25	IV / C	11,20	70,1	7,85	N
LLC 46	82 / M	2	0 / A	13,09	65,2	8,54	N
LLC 47	71 / M	13	0 / A	17,82	80,1	14,27	N
LLC 48	70 / H	5	0 / A	36,72	79,0	29,01	N
LLC 49	51 / M	3	0 / A	69,07	91,4	63,10	N
LLC 50	75 / H	4	0 / A	18,14	73,1	13,26	N
LLC 51	70 / H	4	0 / A	71,73	91,9	65,92	N
LLC 52	43 / H	5	0 / A	48,53	87,4	42,42	N
LLC 53	75 / M	3	0 / A	13,96	54,7	7,64	N

^a Pacientes con más de una muestra. El conteo de leucocitos y linfocitos expresado es la media de las muestras incluidas en el estudio.

^b En el último año. N: No tratamiento; CLB: Clorambucil; F: Fludarabina; MTX: Metrotexato; CFM: Ciclofosfamida; TPH: Trasplante de Precursores Hematopoyéticos.

MATERIAL Y METODOS

En algunos de los estudios también se incluyen donantes sanos así como las tres líneas celulares, dos de ellas humanas y una murina (Tabla M2.).

Tabla M2. Líneas celulares incluidas en el estudio.

id	Nº ATCC	Tipo celular	Origen
Daudi	CCL-213	Linfoblasto B	Linfoma Burkitt humano
HL60	CCL-240	Promieloblasto	Leucemia promielocítica aguda humana
FLC	CRL 1889	Hibridoma	Esplenocitos de eritroleucemia inducida por el virus Friend murino fusionadas con células de mieloma NS-1

2. OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA HUMANA

Para la obtención de las células mononucleares con las que se va a realizar los posteriores experimentos se utiliza sangre total con EDTA como anticoagulante procedente de los pacientes afectados de LLC-B así como de voluntarios sanos.

Tras diluir la sangre a la mitad con PBS estéril (Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 2 mM, NaCl 15 mM pH 7,4) las células mononucleares se separan del resto de las células sanguíneas mediante centrifugación sobre un gradiente de Ficoll: *Lymphoprep* (*Nycomed, Oslo Norway*) a 800g durante 20 minutos y a temperatura ambiente. Una vez recolectadas las células se realizan tres lavados con PBS, a 800g y durante 5 minutos por cada lavado a 4 °C, tras los cuales las células están listas para ser utilizadas posteriormente. Antes de realizar el último lavado con PBS estéril se toma un alícuota de la suspensión celular y se realiza el conteo de las células en cámara de *Neubauer* mediante exclusión con azul de tripán: *Trypan Blue solution (0,4%)* (*Sigma, St. Louis, MO*).

Una vez obtenidas las células mononucleares de sangre periférica, se resuspenden a una concentración de $2-4 \times 10^6$ células/ml en medio de cultivo *RPMI 1640 con L-glutamina* (*BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium*) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (*BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium*), glutamina 2 mM (*GIBCO BRL, Rockville, MD*) y penicilina 100 U/ml-estreptomomicina 100 µg/ml (*BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium*) y se disponen en placa de cultivo *NUNC*.

MATERIAL Y METODOS

3. DROGAS Y REACTIVOS

- Beneflur \bar{O} 50 mg: Fludarabina fosfato (*Schering*, Madrid, España). El preparado viene liofilizado y se reconstituye en un 1 ml de suero fisiológico estéril. La concentración resultante de la solución madre es de 180 mM.
- AG490 5 mg: Tirfostina B42 (*Calbiochem*, San Diego CA). El preparado viene liofilizado y se reconstituye en 1 ml de DMSO estéril. La concentración resultante de la solución madre es de 17 mM.
- JAK3 Inhibitor I 5mg: WHI-P131 (*Calbiochem*, San Diego, CA). El preparado viene liofilizado y se reconstituye en 1 ml de DMSO estéril. La concentración resultante de la solución madre es de 17 mM.
- AG 555 5 mg: Tirfostina B46 (*Calbiochem*, San Diego, CA). El preparado viene liofilizado y se reconstituye en 1 ml de DMSO estéril. La concentración resultante de la solución madre es de 16 mM.
- AG 494 5 mg: Tirfostina B48 (*Calbiochem*, San Diego, CA). El preparado viene liofilizado y se reconstituye en 1 ml de DMSO estéril. La concentración resultante de la solución madre es de 18 mM.
- Dimethyl sulfoxide DMSO: Dimetil sulfóxido (*Merck*, Darmstadt, Germany).
- Interferon-g human (hIFN-g): Interferon- γ recombinante humano (*Roche*, Mannheim, Germany). El preparado viene en forma de solución a una concentración de 100.000 U/ml.

4. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS CELULARES

Para la obtención de los extractos celulares a partir de un número bajo de células se ha seguido básicamente el protocolo diseñado por *Schreiber* y colaboradores (*Schreiber, et al 1989*). Las células obtenidas mediante los métodos anteriormente mencionados se lavan tres veces con TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM) mediante pulso en microfuga hasta 9.500g a 4 °C. Tras los lavados el botón celular es resuspendido en un tampón que llamamos tampón B (HEPES 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, EGTA 0,1 mM y MgCl₂ 5 mM) al que se le añade inmediatamente antes de usarlo DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM y la combinación de inhibidores de proteasas *Complete Mini EDTA-free* que contiene: *Antipain dihydrochloride*, *Calpain Inhibitor I*, *Calpain Inhibitor*

MATERIAL Y METODOS

II, Chymostatin, Hirudin, TLCK-HCl, TPCK, Trypsin-Inhibitor (Roche, Mannheim, Germany), según las indicaciones de la casa comercial.

Tras 10 minutos de incubación en hielo, se añade el mismo volumen del tampón B al que inmediatamente previo a su uso se le ha añadido los inhibidores de proteasas anteriormente citados y el detergente NP-40 al 0,2% y se incuba durante otros 15 minutos en hielo. Después se centrifuga a 15.000g durante 1 minuto a 4 °C y se recoge el sobrenadante que se considera como extracto citoplasmático y se guarda a – 80 °C hasta el momento de ser usado.

La concentración a la que se resuspende el botón celular en tampón B es de 5×10^5 células/ μ l.

5. CITOMETRIA DE FLUJO

La citometría de flujo consiste en un sistema que permite el análisis de distintas características de las células en suspensión de una muestra cuando ésta se somete a un sistema de flujo. Mediante esta técnica se pueden estudiar características intrínsecas de las células como son el tamaño y la morfología celular valorando la intensidad de luz dispersada (*scattered*) en distintos planos (frontal –*forward scatter*- y lateral –*side scatter*-) cuando las células atraviesan el haz de luz emitido por un rayo láser. También se pueden valorar la expresión de distintos antígenos de superficie mediante el uso de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos dirigidos contra dichos antígenos. La señal de luz emitida a una determinada longitud de onda por estos fluorocromos, al ser excitados por el láser del citómetro, puede ser captada por fotomultiplicadores situados en el mismo plano que el detector del *side scatter*.

En este trabajo, se analiza mediante la citometría de flujo la viabilidad celular de las distintas muestras tratadas o no con las drogas que se han empleado en el estudio. Para ello, se utiliza una combinación de una molécula capaz de unirse a superficie de las células que han entrado en apoptosis con varios anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos así como de otra para valorar las células apoptóticas dentro de las distintas poblaciones linfocitarias (Tabla M3.).

MATERIAL Y METODOS

Tabla M3. Reactivos y anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

id	Descripción	Fluorocromo	Laboratorio
rh Annexin V	Anexina V	FITC	Bender MedSystems (Vienna, Austria)
Anti-CD5	Ac. monoclonal murino	PC5	Immunotech (Marseille, France)
Anti-CD19	Ac. monoclonal murino	PE	Immunotech (Marseille, France)

El protocolo que se sigue es el siguiente: se recoge una alícuota de 50 μl de las muestras en cultivo a analizar que se encuentran a una concentración de $2-4 \times 10^6$ células/ml y se le añade 2 μl de la anexina V, 2 μl del anticuerpo anti-CD5 y 2 μl del anticuerpo anti-CD19. Además se añade 200 μl de TBS con Ca_2Cl 5 mM ya que la unión de la anexina V a la fosfatidilserina translocada a la cara externa de la membrana celular en las células apoptóticas precisa de la presencia en el medio de iones calcio. Tras agitar suavemente la suspensión celular, se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo se añaden 250 μl más de TBS con Ca_2Cl 5 mM a la muestra y es procesada en el citómetro de flujo *Epics XL-MCL* (Coulter, Miami, Florida).

6. EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY)

Esta técnica permite el estudio de la interacción entre el ADN y ciertas proteínas. Cuando la proteína de interés se une a una secuencia de ADN marcado radiactivamente, se detecta un retardo en la carrera electroforética de este oligonucleótido o sonda.

La técnica consta de los siguientes pasos:

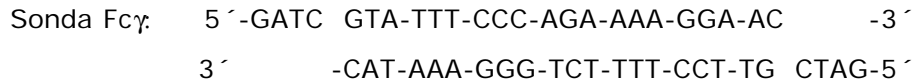
- 6.1. Marcaje radioactivo del oligonucleótido de doble hebra de ADN.
- 6.2. Preparación del gel para la carrera electroforética.
- 6.3. Preparación de las muestras. Incubación con la sonda marcada.
- 6.4. Electroforesis, secado del gel y autorradiografía.
- 6.5. Análisis de los resultados.

6.1. Marcaje radioactivo del oligonucleótido de doble hebra de ADN

Para este estudio se emplea un oligonucleótido sintético (sonda $\text{Fc}\gamma$) que reproduce las secuencias de tipo GAS (*Gamma-Activated Séquence*). Esta

MATERIAL Y METODOS

secuencia a la que unen con gran afinidad los homodímeros de STAT1, se encuentra en el promotor del gen del receptor de alta afinidad para la región constante de la IgG (Fc γ RI).



Para obtener la cadena de doble hebra, los dos oligonucleótidos deben incubarse en un baño a 100 °C y dejarlo enfriar lentamente.

Una vez obtenido el ADN bicatenario se debe marcar radiactivamente en el extremo 5' terminal. Con este fin se emplea el enzima T4 polinucleótido kinasa que cataliza la transferencia del ^{32}P en posición γ del ATP al grupo hidroxilo del extremo 5' terminal del oligonucleótido. Para ello se mezclan en un tubo *ependorf* 1 μl de *Kinase buffer 10x* (*Promega, Madison, WI*), 2 μl del *oligonucleótido* (100 ng), 5 μl (50 μCi) del ATP marcado radioactivamente con $^{32}\text{P}_\gamma$ (*Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK*), 1 μl (10 U) de *T4 polynucleótide kinase* (*Promega, Madison, WI*) y 1 μl de H_2O bidestilada. Tras incubar la mezcla 1 hora a 37 °C se le añade 40 μl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH 8) conteniendo NaCl 50 mM.

El oligonucleótido marcado se purifica utilizando columnas de exclusión molecular de *Sephadex G-50* (*Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) mediante centrifugación a 800g durante 4 minutos a 4 °C en una centrifuga de rotor oscilante.

Por último se cuantifica el marcaje obtenido en la sonda. Para ello se añade 1 μl de la sonda marcada y purificada a 2 ml de líquido de centelleo *OptiPhase "HiSafe"* (*Wallac; Perkin Elmer, Boston, MA*) en un tubo de contaje que se procesa en el contador beta *TRI-CARB 2100TR, Liquid Scintillation Analyzer* (*Packard; Perkin Elmer, Boston, MA*) para determinar las cuentas por minuto en cada microlitro (cpm/ μl) de la sonda marcada.

6.2. Preparación del gel para la carrera electrofóretica

El gel utilizado es un gel de poliacrilamida del 5% no desnaturizante y de baja fuerza iónica que ayuda a mantener la estabilidad de los complejos formados.

MATERIAL Y METODOS

La composición del gel es: 5ml de Acrilamida/bis (29:1) 40% (*BIO-RAD, Hercules, CA*), 2 ml de TBE 10x (Tris 0,9 M, ácido bórico 0,9 M, EDTA 20 mM pH 8), 33 ml de agua bidestilada, 320 µl de persulfato amónico 10% y 34 µl de TEMED.

Para eliminar las trazas de acrilamida y de radicales libres que pueden interferir en la unión ADN-proteína se somete el gel a una precorrida durante 1 hora a 125 V usando como tampón de carrera TBE 0,5x.

6.3. Preparación de las muestras. Incubación con la sonda marcada

En primer lugar antes de preparar las muestras para la carrera se realiza una valoración cuantitativa de las mismas utilizando el método colorimétrico *BIO-RAD Protein Assay (BIO-RAD, Hercules, CA)* con la finalidad de cargar la misma cantidad de proteínas totales de cada una de los extractos.

Seguidamente se prepara la mezcla de reacción que contiene: extracto, *Binding buffer* 5x (HEPES 100 mM pH 7,9, KCl 250 mM, 50% glicerol, DTT 2,5 mM, EDTA 0,5 mM pH 7,9) y ADN tímico de ternera: *Sonicated calf thymus DNA (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)* a una concentración de 2 mg/ml y agua bidestilada.

La mezcla se prepara para cada muestra según el esquema:

Extracto :	4-10 µl.
<i>Binding buffer</i> 5x :	3 µl.
ADN tímico de ternera :	2 µl.
Agua bidestilada :	cantidad suficiente para un volumen final de 13 µl.

La cantidad de cada extracto en la mezcla de reacción viene determinada por su cantidad relativa de proteínas.

La mezcla se deja incubando 10 minutos a temperatura ambiente tras lo cual se añade 2 µl de la sonda marcada con ³²P que previamente se ha diluido en tampón TE con NaCl 50 mM para que la cantidad de cpm que se añade sea de 30.000 cpm/muestra. Las muestras se dejan incubar durante otros 20 minutos a temperatura ambiente tras lo cual ya están listas para ser cargadas en el gel.

MATERIAL Y METODOS

6.4. Electroforesis, secado del gel y autorradiografía

Se cargan los 15 μ l de cada una de las muestras y en uno de los pocillos del gel se carga 15 μ l de azul de bromofenol que sirve como indicador del frente de la corrida electroforética.

La carrera se realiza a un voltaje constante de 200 voltios y el gel se deja correr hasta que el azul de bromofenol llega a unos 3 cm del frente del gel. Después, el gel se seca durante 2 horas a 80 °C en la secadora de geles *GEL DRYER 583 (BIO-RAD, Hercules, CA)*.

Una vez seco el gel se introduce en un *cassette* con una placa de radiografía *Curix RP2 (AGFA, Mortsel, Belgium)*. Generalmente se suele tomar varias autorradiografías de cada gel a diferentes tiempos de exposición para obtener una imagen óptima.

6.5. Análisis de los resultados

La autorradiografía escogida de cada gel se analiza en el equipo de imagen *Fluor-S MultiImager (BIO-RAD, Hercules, CA)* empleando el software *Quantity One 4.3.1. (BIO-RAD, , Hercules, CA)*. De cada una de las LLC-B así como de las controles sanos y de las líneas celulares se realiza la densitometría de las señales radioactivas de la autorradiografía del EMSA. La señal producida por las células tratadas con IFN- γ , al que se considera como control positivo de la activación, se le da arbitrariamente el valor del cien por cien de la señal que las células de esa leucemia pueden producir. La densitometría del resto de las señales de cada uno de los tratamientos que se le ha realizado a cada LLC-B, se refieren de forma porcentual en relación al valor de su respectivo control activado con IFN- γ .

De cada una de las muestras se realizaron tres experimentos de EMSA independientes y una vez densitometradas las señales de todas ellas, se realiza la media para cada extracto. En las figuras de RESULTADOS, cada barra representa la media de los tres experimentos para cada extracto con su correspondiente desviación estándar.

MATERIAL Y METODOS

7. WESTERN BLOT

La técnica de Western Blot permite la identificación de un modo semicuantitativo de un antígeno específico en una solución. La técnica consta de varios pasos:

- 7.1. Separación de las proteínas presentes en la muestra en función de su peso molecular mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia de *Sodium Dodecyl-Sulfate* (SDS).
- 7.2. Transferencia de las proteínas separadas a una membrana sintética.
- 7.3. Detección del antígeno de interés mediante un anticuerpo específico.
- 7.4. Análisis de los resultados.

7.1. Separación de las proteínas presentes en la muestra en función de su peso molecular mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia de *Sodium Dodecyl-Sulfate* (SDS)

Esta técnica se basa en la descrita por *Laemmli* y colaboradores (*Laemmli 1970*). La presencia de SDS, un detergente aniónico tanto en el gel como en el tampón de muestra y en el de carrera, proporciona a las proteínas presentes en la muestra una conformación estirada y además, una carga eléctrica negativa que es proporcional al tamaño de las mismas. Cuando el gel se somete a un campo eléctrico, las proteínas migran a través de éste hacia el ánodo a una velocidad inversamente proporcional a su carga negativa y por tanto a su masa molecular.

La composición del gel de concentración es: 5% *Acrilamida/bis (29:1)* (*BIO-RAD, Hercules, CA*), Tris-HCl 125 mM pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato amónico, 0,01% TEMED.

La composición del gel de resolución es: 10% *Acrilamida/bis (29:1)* (*BIO-RAD, Hercules, CA*), Tris-HCl 370 mM pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato amónico, 0,01% TEMED.

Antes de preparar las muestras para la carrera, se realiza una valoración cuantitativa de la cantidad total de proteínas contenidas en éstas utilizando el método colorimétrico *BIO-RAD Protein Assay* (*BIO-RAD, Hercules, CA*) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Se mezclan dos volúmenes de cada una de las muestras que se van a analizar con un volumen del tampón de muestra 3x (Tris 50 mM, 2% SDS, 5% 2 β -mercaptoetanol, 10% glicerol y 0,005% de azul de bromofenol), se calientan

MATERIAL Y METODOS

durante 5 minutos a 100 °C para desnaturalizar completamente las proteínas tras lo cual se realiza un pulso de microfuga a máxima velocidad y posteriormente se aplican en el gel.

En uno de los pocillos del gel se cargan los marcadores de peso molecular *SDS-PAGE Molecular Weight Standards Broad Range (BIO-RAD, Hercules, CA)*.

La electroforesis se realiza en una *cubeta X Cell II (Novex, San diego, CA)* en unas condiciones de carrera con limitación del amperaje a 30 mA por gel.

La composición del tampón de carrera utilizado en la electroforesis es de Tris base 25 mM, Glicina 192 mM y 0,1% SDS.

7.2. Transferencia de las proteínas separadas a una membrana sintética

Las proteínas separadas electroforéticamente se transfieren a una membrana sintética de Polivinilo difluorido: *PVDF Immobilon P 0,45 μm (Millipore, Billerica, MA)*.

La transferencia que se realiza es semi-seca en una *cubeta FASTBLOT B32 (para un gel) o B33 (para 2 geles) (Whatman Biometra, Goettingen, Germany)* con unas condiciones de 300 mA y 5 W por gel durante 1 hora y 15 minutos.

La composición del tampón de transferencia utilizado es de Tris base 25 mM, Glicina 192 mM y 10% metanol.

7.3. Detección del antígeno de interés mediante un anticuerpo específico

Una vez terminada la transferencia la membrana se incuba con una solución de bloqueo (PBS conteniendo un 5% de leche desnatada en polvo) durante 2 horas a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4 °C.

Seguidamente la membrana se incuba, durante 2 horas a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4 °C, con el primer anticuerpo a la dilución indicada (Tabla M4.) en PBS conteniendo un 3% de leche desnatada. Posteriormente se retira el primer anticuerpo y se incuba con anticuerpos anti-β-actina: *Monoclonal Anti-β-Actin Clone AC-15 (Sigma, St. Louis, MO)* a una dilución 1/20.000-1/50.000 durante 30 minutos a temperatura ambiente. La posterior detección de la β-actina nos sirve para valorar la carga proteica presente en cada muestra. Tras estas incubaciones la membrana se lava 3 veces (10 minutos cada lavado) con PBS conteniendo un 3% de leche desnatada después de lo cual se

MATERIAL Y METODOS

incuba con el segundo anticuerpo: *ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG, (H+L), Peroxidase Conjugated* (Pierce, Rockford, IL) a una dilución 1/20.000 en PBS conteniendo un 3% de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se vuelve a lavar 3 veces con PBS conteniendo un 3% de leche desnatada y dos veces más con PBS durante 5 minutos.

Tabla M4. Anticuerpos primarios utilizados en el *Western-blot*.

id	Descripción	Dilución	Laboratorio
Anti-b Actina	Ac. monoclonal murino	1/20.000-1/50.000	Sigma (St. Louis, MO)
Anti-CD5	Ac. monoclonal murino	1/200	Immunotech (Marseille, France)
Anti-CD19	Ac. monoclonal murino	1/200	Immunotech (Marseille, France)
Anti-STAT1	Ac. monoclonal murino	1/200-1/500	BD Biosciences (San Lose, CA)
Anti-STAT3	Ac. policlonal de conejo	1/1.000	Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, CA)

Por último la membrana se revela mediante quimioluminiscencia utilizando el *kit ECL* (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) o el *kit Supersignal[®] West Dura Extended Duration Substrate* (Pierce, Rockford, IL). La membrana se introduce en un *cassette* con una placa de radiografía *Curix RP2* (AGFA, Mortsel Belgium). Se suelen tomar varias exposiciones a diferentes tiempos para obtener una imagen óptima.

En algunos casos las membranas se tratan tras el revelado para poder ser reutilizadas. Para ello la membrana se lava con PBS (2 lavados de 10 minutos cada uno) tras lo cual se incuba primero durante 15 minutos con el tampón *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Pierce, Rockford, IL) a temperatura ambiente y luego otros 15 minutos con el mismo tampón a 37 °C. Por último se lava de nuevo la membrana con PBS conteniendo un 3% de leche desnatada (2 lavados de 5 minutos cada uno) de modo que la membrana está lista para ser incubada de nuevo con el primer anticuerpo.

7.4. Análisis de los resultados

La imagen escogida de cada membrana de *Western-blot* se analiza en el equipo de imagen *Fluor-S MultiImager* (BIO-RAD, Hercules, CA) empleando el software *Quantity One 4.3.1*. (BIO-RAD, Hercules, CA). De cada una de las LLC-B así como de las controles sanos se realiza la densitometría de las señales de la autoradiografía escogida. Se hace la proporción entre la señal producida por cada

MATERIAL Y METODOS

anticuerpo a cada uno de los tres tiempos de la realización de los extractos (24, 48 y 72 horas) y la producida por la β -actina a ese mismo tiempo tanto para el extracto proveniente de las células control sin tratar como para el extracto de las células tratadas con fludarabina a una dosis de 50 μ M. De esta manera se sabe la cantidad relativa de la proteína reconocida por cada anticuerpo monoclonal presente en cada muestra independientemente de la carga proteica total de cada extracto.

8. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional es el método de elección para separar simultáneamente los múltiples componentes individuales en mezclas complejas de proteínas. La primera dimensión separa las proteínas en función de su punto isoeléctrico (electroenfoque) utilizando gradientes inmovilizados de pH (IPG: *Immobilized pH Gradient*) y la segunda dimensión lo hace en función del tamaño de la proteína mediante un gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). En esta técnica se realizan los siguientes pasos:

- 8.1. Preparación de la muestra.
- 8.2. Isoelectroenfoque.
- 8.3. Segunda dimensión mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.
- 8.4. Detección de las proteínas. Tinción de plata.
- 8.5. Análisis de los resultados.

8.1. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra comprende la solubilización, desnaturalización y reducción de las proteínas presentes en el extracto para evitar las interacciones entre las mismas. Además se debe eliminar todo aquello que pueda producir interferencias en el proceso de electroenfoque como es el caso de la presencia de concentraciones elevadas de sales, de detergentes iónicos o de contaminantes no proteicos como ácidos nucleicos y lípidos. En nuestro estudio se parte de extractos proteicos realizados con el tampón que se describe en la sección 4 de MATERIAL Y METODOS. Para realizar esta purificación de las proteínas presentes en la muestra se usa el Kit comercial *PlusOne 2-D Clean-Up* (Amersham Pharmacia Biotech,

MATERIAL Y METODOS

Uppsala, Sweden) según las instrucciones de la casa comercial. Tras la purificación las proteínas se redisuelven en el tampón que más interese, en nuestro caso en 125 μ l del tampón de hidratación: Urea 8 M, 2% Triton X-100, 0,1% azul de bromofenol, 2% 3-10 NL IPG Buffer (*Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) al que se añade 20 mM de DTT justo en el momento de ser usado.

8.2. Isoelectroenfoque

Una vez que tenemos la muestra purificada y redisuelta en el tampón de hidratación se procede al electroenfoque de las proteínas de la muestra y para ello se debe escoger el gradiente de pH que se va a utilizar. En nuestro caso el gradiente elegido se encuentra entre un pH 3 y un pH 10, útil para visualizar un amplio espectro de las proteínas presentes en la muestra. Para ello se utiliza las tiras comerciales 3-10 NL IPGStrip (*Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) de 7 cm de longitud.

De cada una de las muestras ya preparadas se aplica los 125 μ l en un carril del *Immobiline DryStrip Reswelling Tray* (*Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) y luego se coloca la tira IPG sin el plástico protector con la cara del gel en contacto con la muestra. Posteriormente se recubren las tiras con aceite mineral *IPG Cover Fluid* (*Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) y se deja rehidratándose toda la noche a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se lava el exceso de aceite mineral de las tiras IPG con agua bidestilada y se procede al isoelectroenfoque de la muestra en el aparato *Multiphor II* (*Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) a 300 V y 1 mA/tira IPG durante un minuto y a 3.500 V y 1 mA/tira IPG durante 5 horas manteniendo siempre el sistema a una temperatura de 20 °C. Una vez finalizado el electroenfoque se retiran las tiras IPG y se lava el exceso de aceite mineral con agua bidestilada. Las tira IPG de esta manera están listas para pasar a realizar la segunda dimensión o bien se pueden guardar a -20 °C hasta el momento de ser utilizadas.

MATERIAL Y METODOS

8.3. Segunda dimensión mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

En nuestro caso la segunda dimensión se ha realizado utilizando geles comerciales *Bis Tris NuPAGE 4-12% 2-D (Invitrogen, Carlsbad, CA)*. El gel de la tira IPG electroenfocada se corta 0,5 cm de cada uno de los extremos quedando de esta manera un rango de pH entre 3,4 y 9,8 aproximadamente (Figura M1.).

La tira IPG se incuba durante 15 minutos en el tampón de muestra *LDS Sample Buffer 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA)* al que se le añade DTT 70 mM en el momento de ser usado. Tras lavar el exceso de tampón de muestra con agua bidestilada se coloca la tira IPG en el gel comercial y se procede a la electroforesis que tiene lugar en el tampón de carrera comercial *MES SDS URNG Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA)* con unas condiciones de 200 V y 25 mA/gel durante 3 horas.

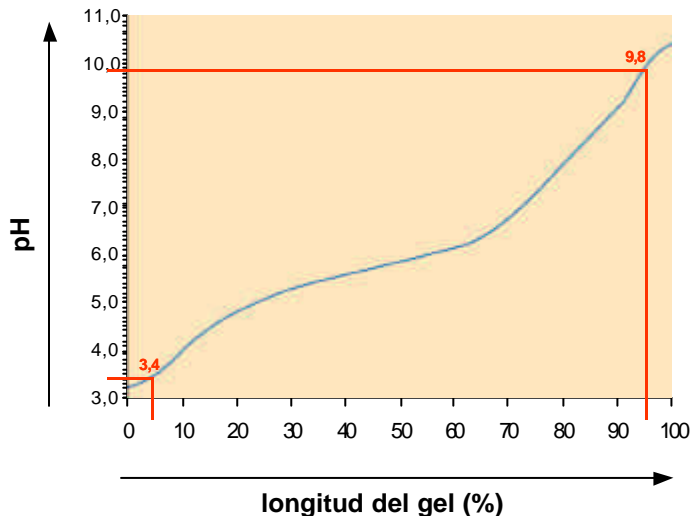


Figura M1. Cálculo del rango de pH de la tira 3-10 NL IPGStrip de 7 cm de longitud. En el eje de X se representa - en porcentaje- la longitud total de la tira 3-10 NL IPGStrip. En el eje Y se representa el rango de pH cubierto por la tira 3-10 NL IPGStrip. La marcas rojas indican el rango de pH que resulta tras cortar 0,5 cm de cada uno de los extremos de la tira. Gráfico del manual de instrucciones de *Immobiline DryStrip (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)*.

MATERIAL Y METODOS

8.4. Detección de las proteínas. Tinción de plata

Tras finalizar la electroforesis el gel se separa del *cassette* de electroforesis y se coloca en una bandeja donde se procede a la tinción de plata siguiendo el siguiente protocolo:

Fijación : 2 veces (15 minutos / vez) : 40% Etanol
10% Acido acético

Sensibilización : 30 minutos : 30% Etanol
6,8% Acetato sódico
0,2% Tiosulfato sódico

Lavados : 3 veces (5 minutos / vez) : agua bidestilada

Tinción : 20 minutos 2,5% Nitrato de plata

Lavados : 3 veces (5 minutos / vez) : agua bidestilada

Revelado : 2 veces (5 minutos / vez) : 2,5% Carbonato sódico
0,014% Formaldehido

Parada : 10 minutos : 1,46% EDTA disódico

Lavados : 3 veces (5 minutos / vez) : agua bidestilada

8.5. Análisis de los resultados

Una vez finalizada la tinción se realiza una fotografía digital de cada gel con el equipo de imagen *Fluor-S Multimager (BIO-RAD, Hercules, CA)* empleando el software *Quantity One 4.3.1. (BIO-RAD, Hercules, CA)*.

9. ANALISIS IN VITRO DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE LLC-B Y LAS CELULAS ADHERENTES A LA PLACA TRAS CULTIVOS PROLONGADOS

Cuando se mantienen en cultivo células mononucleares de pacientes con LLC-B durante un tiempo prolongado (10-14 días) crecen en el fondo de la placa de cultivo en número variable, dependiendo de la leucemia, unas células adherentes de

MATERIAL Y METODOS

morfología diversa. Se ha descrito que estas células podrían ejercer un papel de "nodrizas" (NLC: *nurse-like cells*) de las células tumorales de LLC-B protegiendo a éstas de la entrada en apoptosis ya sea bien mediante una interacción célula-célula, bien mediante la secreción de factores solubles al medio extracelular.

En este trabajo se analiza el fenotipo de estas células adherentes, su papel protector sobre las células tumorales de pacientes con LLC-B, tanto en la apoptosis espontánea como en la apoptosis inducida por fludarabina así como el efecto que fludarabina tiene sobre las células NLC.

Para estudiar estos parámetros se realizan las siguientes técnicas y experimentos:

- 9.1. Estudio fenotípico de las NLC mediante inmunohistoquímica.
- 9.2. Estudio del efecto protector de las NLC en la apoptosis espontánea *in vitro* de las células LLC-B CD19+/CD5+.
- 9.3. Estudio del efecto de fludarabina sobre las NLC.
- 9.4. Estudio del efecto protector de las NLC en la apoptosis inducida por fludarabina de las células LLC-B CD19+/CD5+.

9.1. Estudio fenotípico de las NLC mediante inmunohistoquímica

Para analizar el fenotipo de las células adherentes a la placa de cultivo se emplea la técnica de inmunohistoquímica.

En una de las placas en las que se ha dejado crecer previamente las células adherentes se retiran las células en suspensión, se lava tres veces con PBS y otras dos veces más con metanol. Tras los lavados se corta la parte superior de la placa y se procede a la fijación de las células adherentes con una mezcla de metanol y acetona 1:1 durante 10 minutos y posteriormente se hidrata la superficie de la placa con PBS durante 10 minutos.

Con un lapicero hidrofóbico *PAN PEN (The Binding Site, Birmingham, UK)* se procede a dibujar una serie de círculos sobre la superficie de la placa para delimitar la posterior zona de incubación de cada uno de los anticuerpos primarios que se van a usar.

Tras este proceso se procede a la incubación en cada uno de los círculos con uno de los anticuerpos primarios que se enumeran en la Tabla M5. La incubación se realiza durante 30 minutos y a temperatura ambiente.

MATERIAL Y METODOS

Tabla M5. Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de Inmunohistoquímica.

id	Descripción	Dilución	Laboratorio
Anti-CD13	Ac. monoclonal murino	1/100	<i>DAKO (Golstrup, Denmark)</i>
Anti-CD14	Ac. monoclonal murino	1/100	<i>DAKO (Golstrup, Denmark)</i>
Anti-CD15	Ac. monoclonal murino	1/100	<i>DAKO (Golstrup, Denmark)</i>
Anti-CD19	Ac. monoclonal murino	1/100	<i>DAKO (Golstrup, Denmark)</i>
Anti-CD33	Ac. monoclonal murino	1/100	<i>DAKO (Golstrup, Denmark)</i>
Anti-CD34	Ac. monoclonal murino	1/100	<i>DAKO (Golstrup, Denmark)</i>
(class III)			
Anti-CD45	Ac. monoclonal murino	1/100	<i>DAKO (Golstrup, Denmark)</i>
Anti-CD133	Ac. monoclonal murino	1/100	<i>DAKO (Golstrup, Denmark)</i>
Anti-HLA DR	Ac. monoclonal murino	1/100	<i>DAKO (Golstrup, Denmark)</i>
(a-chain)			

Una vez finalizada la incubación con los anticuerpos primarios, se realizan lavados con PBS durante 20 minutos cambiando el PBS de la placa cada 5 minutos. Tras los lavados, se realiza la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina *APAAP Mouse Monoclonal (DAKO, Glostrup, Denmark)* diluido 1/50 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, se realizan los lavados con PBS de manera similar a la vez anterior tras los cuales se procede a realizar la reacción de color utilizando el *kit* comercial *DAKO FAST RED SUBSTRATE SYSTEM (DAKO, Glostrup, Denmark)* siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La reacción produce una tinción de color rojo en aquellas células que resultan positivas.

Una vez finalizada la reacción se coloca un cubreobjetos sobre la placa y se visualiza en el microscopio óptico *ZEISS West Germany Axioskop (Carl Zeiss, Thornwood, NY)*. Mediante la cámara digital *SPOT Caged Digital Camera* y el software *SPOT 32 version 2.1.2 (Diagnostic Instruments, Inc, Sterling Heights, MI)* se captan las imágenes digitales de cada uno de los círculos incubados con cada anticuerpo primario.

Los experimentos descritos en los apartados 9.2. y 9.4. de esta sección se realizaron conjuntamente pero para una mejor comprensión se han desglosado en los dos apartados mencionados.

MATERIAL Y METODOS

9.2. Estudio del efecto protector de las NLC en la apoptosis espontánea *in vitro* de las células LLC-B CD19+/CD5+

El estudio del papel protector que las NLC ejercen en la apoptosis espontánea *in vitro* de las células tumorales de LLC-B, se lleva a cabo con tres muestras siguiendo el esquema de la Figura M1 que representa el experimento que hemos denominado TRATAMIENTO CRUZADO 1.

Tras disponer las células mononucleares de los tres pacientes con LLC-B (LLC 48A, LLC 49A y LLC 50A) en tres placas de cultivo estériles (*TPP, Trasadingen, Switzerland*), éstas se cultivan durante 14 días para permitir el crecimiento de las células adherentes (Figura M2.).

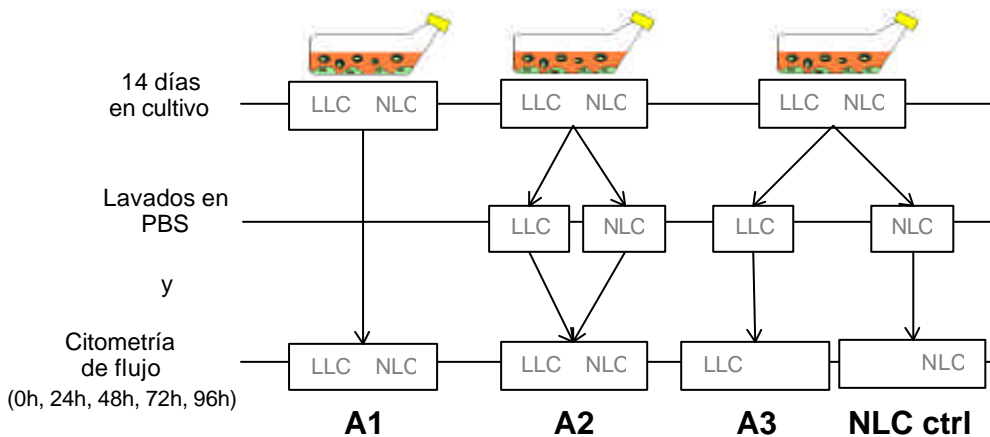


Figura M2. Representación esquemática del experimento TRATAMIENTO CRUZADO 1. Células mononucleares de tres pacientes con LLC-B (LLC 48A, LLC 49A, LLC 50A) se mantienen en cultivo durante 14 días para permitir el crecimiento de las células NLC. Una de las placas de cultivo se mantiene como control de apoptosis espontánea (**A1**). Como control de manipulación, células en suspensión (LLC) y NLC (NLC) de otra placa de cultivo se separan, se lavan con PBS, y se vuelven a cultivar juntas (**A2**). Las células en suspensión y las NLC de la tercera placa se separan, se lavan en PBS tras lo cual, las células en suspensión se cultivan sin NLC (**A3**). La apoptosis de las células CD19+/CD5+ de cada placa de cultivo se analiza mediante tinción con anexina V a las 0 horas (inicio del experimento), a las 24 horas (inmediatamente después del tratamiento cruzado), a las 48, 72 y 96 horas.

Transcurrido este tiempo, una de las placas se mantiene en cultivo durante todo el experimento sin ninguna manipulación (Figura M2: A1). La placa A1 servirá como control de la apoptosis basal de las células CD19+/CD5+. De las otras dos placas de cultivo se separan las células en suspensión (Figura M2: LLC) y las células adherentes (Figura M2: NLC) y se lavan ambas tres veces con PBS estéril.

MATERIAL Y METODOS

Posteriormente las células LLC se resuspenden en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado. Las células LLC de la placa A2 se vuelven a cultivar con las células NLC de la misma placa. La placa A2 servirá como control de la apoptosis de las células CD19+/CD5+ debida a la manipulación. Las células LLC de la placa A3 se cultivan en una placa nueva en ausencia de células NLC. La placa A3 servirá para valorar la apoptosis de las células CD19+/CD5+ debido a la ausencia en el cultivo de células NLC.

De todas las placas de cada una de las muestras se recogen alícuotas a las 0 horas (inicio del experimento), a las 24 horas (inmediatamente después del tratamiento cruzado), a las 48, 72 y 96 horas. Las alícuotas son analizadas mediante citometría de flujo para valorar la viabilidad de las células CD19+/CD5+ tal y como se describe en la sección 5 de MATERIAL Y METODOS.

A las células NLC provenientes de la placa A3 (NLC ctrl) se les añade medio de cultivo RPMI 1640 suplementado y se mantienen en cultivo. Estas células se usarán como control de la apoptosis basal de las células NLC tal y como se detalla en la siguiente sección.

9.3. Estudio del efecto de fludarabina sobre las NLC

Las células NLC sin tratar (Figura M2: NLC ctrl) y las células tratadas con fludarabina 50 μ M durante 24 horas (Figura M3: NLC flu) de los tres pacientes con LLC-B (LLC 48A, LLC 49A y LLC 50A) se mantuvieron en cultivo durante 10 días. Transcurrido este tiempo, se lavaron tres veces con PBS estéril y se examinaron las mismas mediante exclusión con azul de tripán.: *Trypan Blue solution (0,4%) (Sigma, St. Louis, MO)*. Para ello se eligieron 6 campos microscópicos aleatorios en cada una de las placas y para cada una de las muestras.

9.4. Estudio del efecto protector de las NLC en la apoptosis inducida por fludarabina de las células LLC-B CD19+/CD5+

Para analizar el posible efecto protector de las NLC en la apoptosis inducida por fludarabina de las células tumorales de LLC-B, se realiza un experimento que denominamos TRATAMIENTO CRUZADO 2 y que se esquematiza en la Figura M3.

En este experimento, tras disponer las células mononucleares de los tres pacientes con LLC-B (LLC 48A, LLC 49A y LLC 50A) en cinco placas de cultivo

MATERIAL Y METODOS

estériles (TPP, Trasadingen, Switzerland), se cultivan durante 14 días para permitir el crecimiento de las células adherentes. Transcurrido este tiempo, cuatro placas de cada LLC-B se tratan durante 24 horas con fludarabina 50 μ M. Una de las placas tratadas con fludarabina se mantiene en cultivo durante todo el experimento sin ninguna manipulación (Figura M3: F1). La placa F1 servirá como control de la apoptosis inducida por fludarabina de las células CD19+/CD5+. De las otras tres placas tratadas con fludarabina y la placa no tratada se separan las células en suspensión (Figura M3: LLC) y las células adherentes (Figura M3: NLC) y se lavan ambas tres veces con PBS estéril.

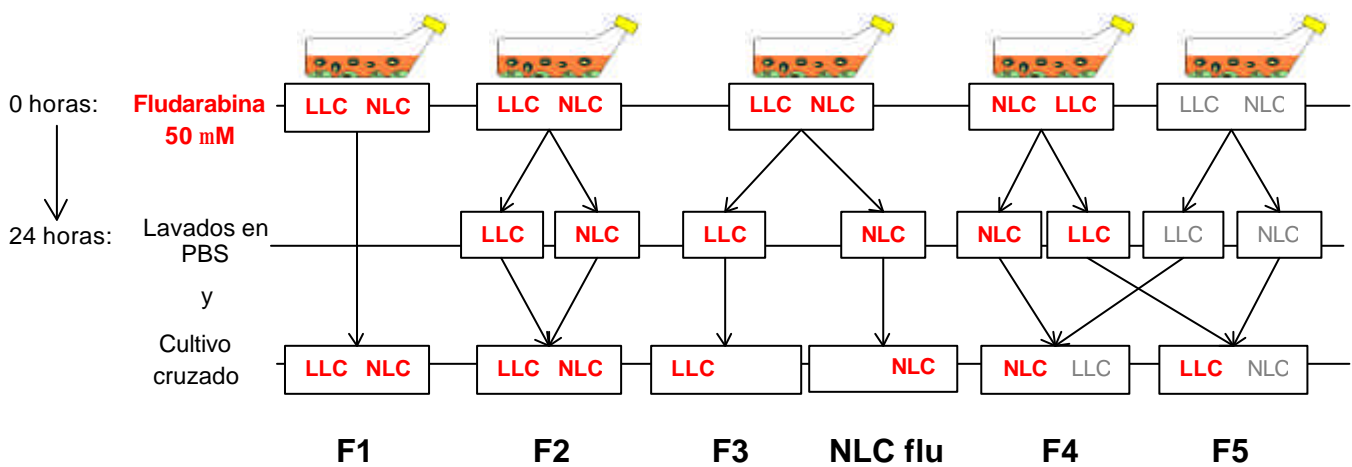


Figura M3. Representación esquemática del experimento TRATAMIENTO CRUZADO 2. Células mononucleares de tres pacientes con LLC-B (LLC 48A, LLC 49A, LLC 50A) se mantienen en cultivo durante 14 días para permitir el crecimiento de las células NLC. Transcurrido este tiempo cuatro placas de cada LLC-B se tratan durante 24 horas con fludarabina 50 μ M (rojo) y una placa se mantiene sin tratar. Posteriormente las células en suspensión (LLC) y las NLC (NLC) se separan, se lavan con PBS y se vuelven a cultivar según las siguientes combinaciones: **F1**: control de la apoptosis inducida por fludarabina; **F2**: células en suspensión y NLC tratadas con fludarabina; **F3**: células en suspensión tratadas cultivadas sin NLC; **F4**: células en suspensión sin tratar y NLC tratadas con fludarabina y; **F5**: células en suspensión tratadas con fludarabina y NLC sin tratar. La apoptosis de las células CD19+/CD5+ de cada placa se analiza mediante la tinción con anexina V a las 0 horas (inmediatamente antes del tratamiento con fludarabina), 24 horas (inmediatamente después del tratamiento cruzado), 48, 72 y 96 horas después del tratamiento con fludarabina.

Tras los lavados, las células LLC se resuspenden en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado y se vuelven a cultivar con las células NLC según las siguientes combinaciones:

MATERIAL Y METODOS

- Placa F2: células LLC y células NLC tratadas con fludarabina 50 μM durante 24 horas.
- Placa F3: células LLC tratadas con fludarabina 50 μM durante 24 horas cultivadas en ausencia de NLC.
- Placa F4: células LLC sin tratar y células NLC tratadas con fludarabina 50 μM durante 24 horas.
- Placa F5: células LLC tratadas con fludarabina 50 μM durante 24 horas y células NLC sin tratar.

De todas las placas de cada una de las muestras se recogen alícuotas a las 0 horas (inmediatamente antes del tratamiento con fludarabina), a las 24 horas (inmediatamente después del tratamiento cruzado), a las 48, 72 y 96 horas. Las alícuotas son analizadas mediante citometría de flujo para valorar la viabilidad de las células CD19+/CD5+ tal y como se describe en la sección 5 de MATERIAL Y METODOS.

A las células NLC provenientes de la placa F3 (NLC flu) se les añade medio de cultivo RPMI 1640 suplementado y se mantienen en cultivo. Estas células se usarán para valorar la apoptosis inducida por fludarabina de las células NLC tal y como se detalla en la sección 9.3. de MATERIAL Y METODOS.

Los experimentos descritos en las secciones 9.2. y 9.4. se realizaron a otras tres LLC-B (LLC 51A, LLC 52A y LLC 53A). En estas muestras no se realizaron los controles A3 (Figura M2.) y F3 (Figura M3.) y el estudio de apoptosis mediante citometría de flujo se realizó a las 0, 24, 48 y 72 horas.

10. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados de los EMSA se muestran como la media \pm la desviación estándar de los tres experimentos realizados para cada una de las muestras analizadas.

Los resultados del análisis de la apoptosis en el estudio de la interacción entre las células tumorales y las células NLC se muestran como la media \pm desviación estándar de tres experimentos distintos realizados para cada una de las muestras estudiadas.

Para todos los estudios de comparación entre variables cuantitativas ha sido aplicado el test de la *t* de Student.

MATERIAL Y METODOS

Todo los estudios de correlación entre variables cuantitativas se han realizado usando el coeficiente de correlación de *Pearson*.

En todos los casos, se ha considerado como significativamente estadístico una valor de $p < 0,05$.

Los datos estadísticos han sido analizados usando el *software SPSS for Windows Release 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)*.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. EL EFECTO IN VITRO DE LA FLUDARABINA Y LOS INHIBIDORES DE JAK KINASAS ES DOSIS DEPENDIENTE

En primer lugar se ha analizado la dependencia respecto a la dosis empleada en el cultivo del efecto *in vitro* que fludarabina, AG490 y WHI-P131 tienen sobre la viabilidad de las células tumorales de pacientes con LLC-B.

En el caso de la fludarabina, cuando se analiza la expresión de anexina V en las células CD19+/CD5+ tratadas durante 72 horas con cuatro distintas concentraciones de fludarabina, el pico de expresión es mayor cuanto mayor es la dosis de droga empleada (Figura R1.).

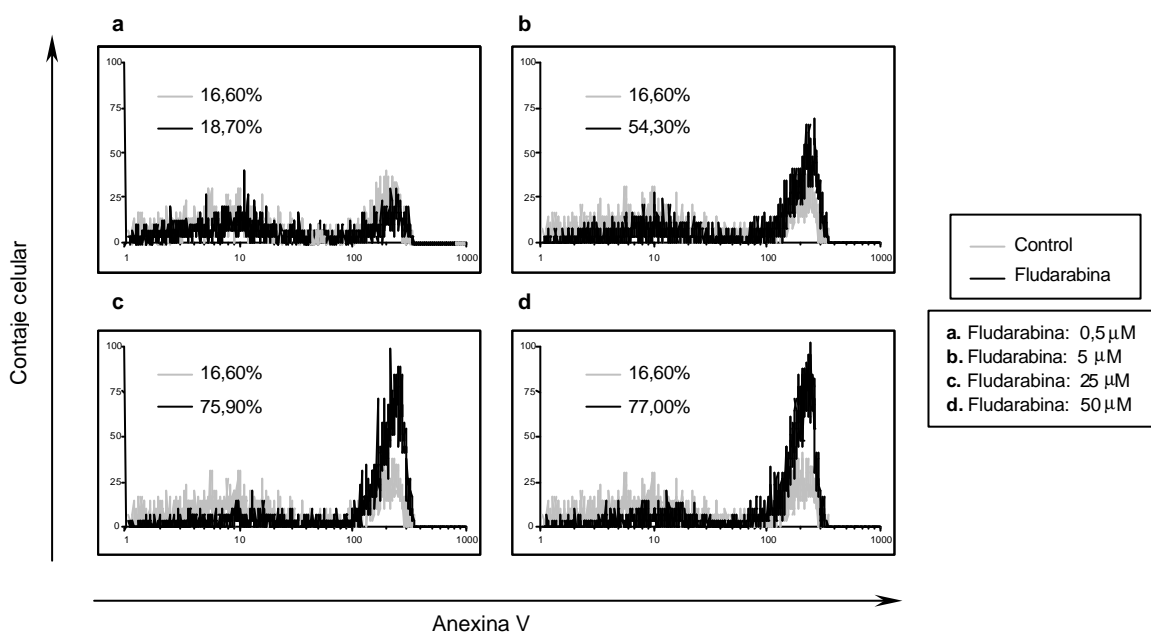


Figura R1. Efecto dosis dependiente de la apoptosis inducida por fludarabina en una leucemia representativa.

Tras 72 horas de tratamiento con cuatro dosis de fludarabina, se analiza mediante citometría de flujo el porcentaje de células CD19+/CD5+ marcadas con anexina V en la leucemia LLC 6A. Se observa que la apoptosis inducida por fludarabina es mayor a más alta dosis de droga empleada.

En la Tabla R1. se muestran los valores expresados en tanto por ciento de las células CD19+/CD5+ anexina V + de otras cuatro LLC-B. En todas ellas se puede observar que fludarabina tras 72 horas de tratamiento produce la entrada en apoptosis de las células tumorales y que ésta es dosis dependiente.

RESULTADOS

Tabla R1. Apoptosis de las células LLC-B tras el tratamiento con cuatro dosis de fludarabina.

Id pacientes	CD19+/CD5+ Anexina V + (%) 72 horas				
	Control	Fludarabina 0,5 mM	Fludarabina 5 mM	Fludarabina 25 mM	Fludarabina 50 mM
LLC 13D	30,90	42,10	46,50	65,60	77,50
LLC 38A	5,64	7,97	49,40	68,90	75,20
LLC 40A	17,70	21,00	51,00	71,00	80,20
LLC 41A	23,60	31,10	48,10	48,60	65,90

También se analiza la dependencia de la dosis en los cultivos tratados con los inhibidores de JAK kinasas, AG490 y WHI-P131.

La expresión de anexina V en las células CD19+/CD5+ tras 72 horas de tratamiento con cuatro distintas concentraciones de AG490 es progresivamente mayor a mayor dosis de droga empleada (Figura R2.).

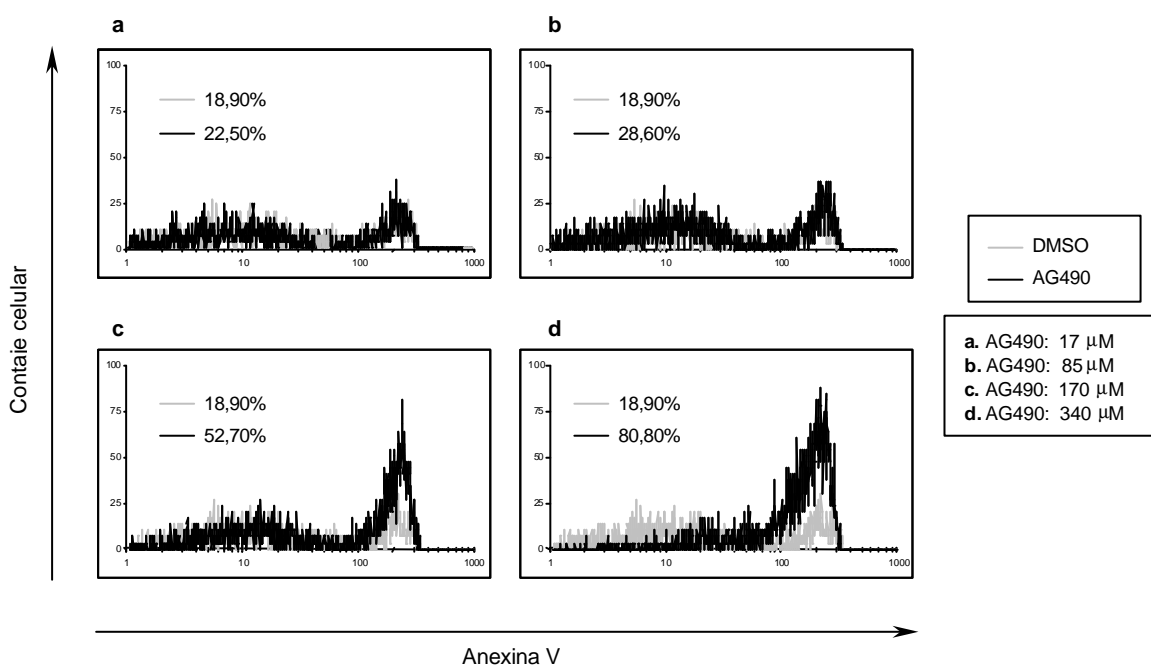


Figura R2. Efecto dosis dependiente de la apoptosis inducida por AG490 en una leucemia representativa. Tras 72 horas de tratamiento con cuatro dosis de AG490, se analiza mediante citometría de flujo el porcentaje de células CD19+/CD5+ marcadas con anexina V en la leucemia LLC 6A. Se observa que la apoptosis inducida por AG490 es mayor a más alta dosis de droga empleada.

RESULTADOS

En el caso de WHI-P131, tras 72 horas de tratamiento con tres concentraciones distintas de la droga, la expresión de anexina V en las células CD19+/CD5+ también es mayor a mayor dosis de WHI-P131 (Figura R3.).

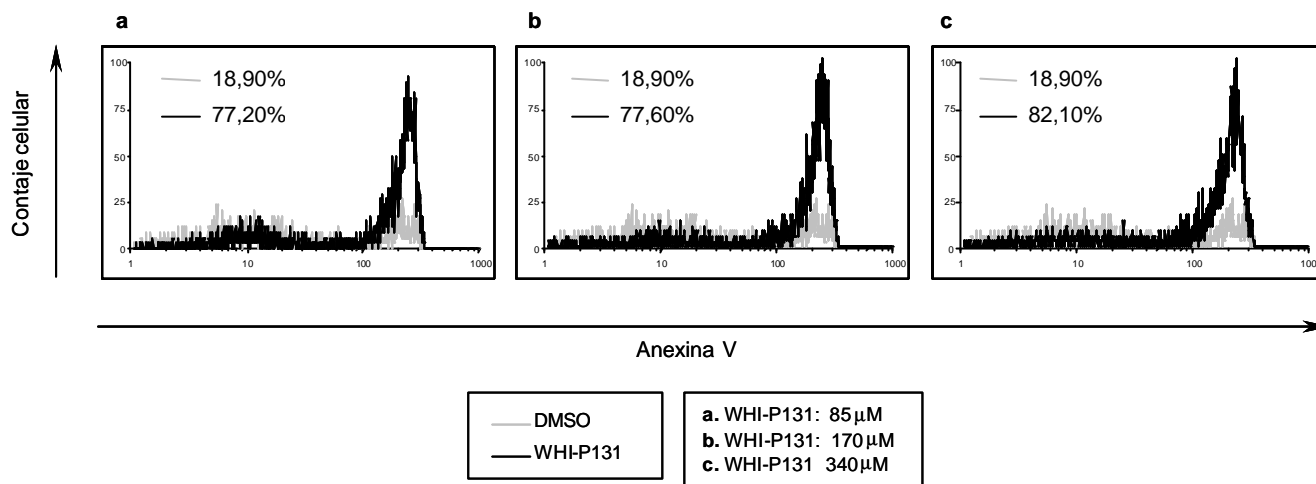


Figura R3. Efecto dosis dependiente de la apoptosis inducida por WHI-P131 en una leucemia representativa.

Tras 72 horas de tratamiento con tres dosis de WHI-P131, se analiza mediante citometría de flujo el porcentaje de células CD19+/CD5+ marcadas con anexina V en la leucemia LLC 6A. Se observa que la apoptosis inducida por WHI-P131 es mayor a más alta dosis de droga empleada.

La dependencia de la dosis empleada en el cultivo también se analiza en el efecto que el tratamiento previo con fludarabina, AG490 y WHI-P131 tienen inhibiendo la activación de STAT1 producida por IFN- γ .

Cuando se analiza mediante EMSA la formación de dímeros de STAT1 activados en los extractos citoplasmáticos de células mononucleares de pacientes con LLC-B, se observa que la inhibición de la activación de STAT1, en caso de que produzca, tras 24 horas de tratamiento con las distintas drogas, fludarabina, AG490 y WHI-P131, es mayor cuanto mayor es la dosis de la droga empleada en el cultivo celular (Figura R4.).

RESULTADOS

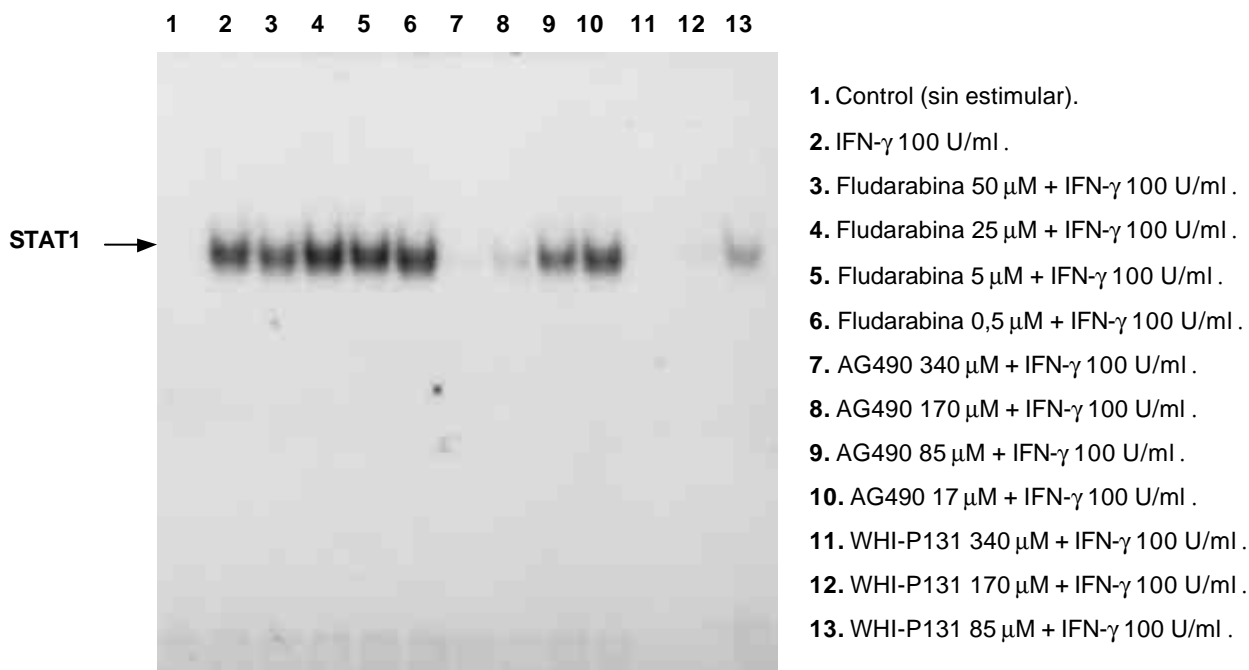


Figura R4. Efecto dosis dependiente de la inhibición de la activación de STAT1 inducida por las drogas en una leucemia representativa. Tras 24 horas de tratamiento con cuatro dosis de fludarabina, cuatro de AG490 y tres de WHI-P131, se analiza mediante EMSA la formación de homodímeros activados de STAT1 en la leucemia LLC 6A. Se observa cierta inhibición de la activación de STAT1 inducida con la más alta dosis de fludarabina empleada. En caso de AG490 y WHI-P131 la inhibición de STAT1 es dosis dependiente.

En la Tabla R2. se muestran los datos de la densitometría de las señales radioactivas de los EMSA de otras cuatro LLC-B que se trataron con las cuatro dosis de fludarabina. A la señal producida por las células tratadas con IFN- γ , control positivo de la activación, se le ha dado arbitrariamente el valor de 100 de modo que la densitometría del resto de las señales de cada LLC-B se han referido al valor de su respectivo IFN- γ (MATERIAL Y METODOS sección 6.5.). Se observa que en dos de las leucemias, LLC 13D y LLC 41A se produce inhibición de la activación de STAT1 por IFN- γ siendo esta inhibición dosis dependiente, mientras que en las dos LLC-B restantes, LLC 38A y LLC 40A, no se produce inhibición de la activación de STAT1 ni aún con las dosis más altas de fludarabina.

En el resto del estudio, las dosis empleadas son de 5 μ M y 50 μ M para fludarabina y las dosis de 85 μ M y 170 μ M para AG490 y WHI-P131.

RESULTADOS

Tabla R2. Inhibición de la activación de STAT1 tras 24 horas el tratamiento con cuatro dosis de fludarabina.

Id pacientes	Control	IFN-g 100U/ml 30 minutos	Fluda bina			
			0,5 mM	5 mM	25 mM	50 mM
			+ IFN-g 100 U /ml 30 minutos			
LLC 6A	2,01 ± 0,74	100 ± 0,96	90,91 ± 0,72	118,67 ± 2,73	112,10 ± 3,28	109,41 ± 4,75
LLC 13D	-0,21 ± 2,17	100 ± 2,75	76,80 ± 6,64	63,43 ± 7,42	59,43 ± 6,77	44,59 ± 7,57
LLC 38A	0,10 ± 2,17	100 ± 2,52	103,70 ± 7,78	106,38 ± 3,75	105,34 ± 4,25	101,11 ± 2,02
LLC 40A	14,66 ± 9,82	100 ± 1,88	109,94 ± 3,05	106,85 ± 0,68	104,29 ± 3,10	97,61 ± 1,57
LLC 41A	1,71 ± 0,70	100 ± 5,58	83,25 ± 1,45	61,27 ± 0,94	24,8 ± 0,80	20,57 ± 0,43

2. EL EFECTO IN VITRO DE LA FLUDARABINA Y LOS INHIBIDORES DE JAK KINASAS ES TIEMPO DEPENDIENTE

El efecto de la fludarabina y los inhibidores de JAK kinasas, AG490 y WHI-P131, sobre la viabilidad de las células LLC-B es dependiente del tiempo de actuación de la droga en el cultivo celular. En todas las LLC-B incluidas en el estudio, el porcentaje de células CD19+/CD5+ anexina V + en el análisis por citometría de flujo para cada concentración de droga utilizada en el cultivo, es paulatinamente mayor cuanto más es el tiempo de exposición a la droga. En la Figura R5. se muestra el porcentaje de células CD19+/CD5+ anexina V + a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento con fludarabina 50 μ M, AG490 170 μ M y WHI-P131 170 μ M en tres LLC-B representativas en las que se observa el aumento progresivo de la apoptosis a lo largo del tiempo.

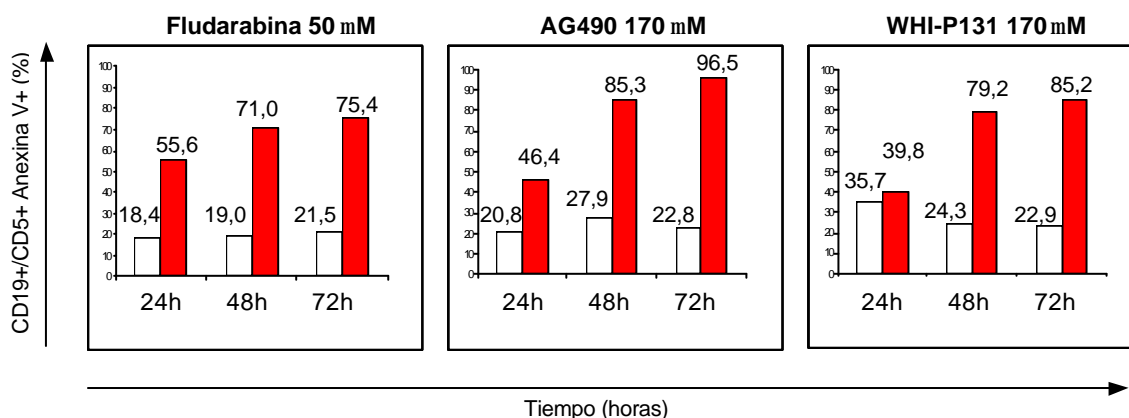
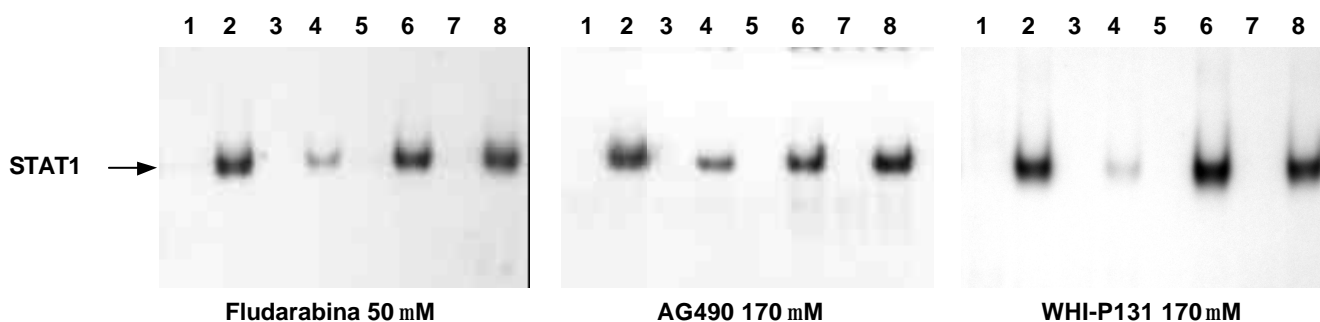


Figura R5. Efecto tiempo dependiente de la apoptosis inducida por las drogas en tres leucemias representativas. Se analiza mediante citometría de flujo el porcentaje de células CD19+/CD5+ marcadas con anexina V en la leucemia LLC 7A (fludarabina 50 μ M), LLC 34A (AG490 170 μ M), LLC 40A (WHI-P131 170 μ M) a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Se observa que la apoptosis inducida por las drogas va aumentando con el tiempo de tratamiento.

RESULTADOS

El efecto de la fludarabina y los inhibidores de JAK kinasas, AG490 y WHI-P131, inhibiendo la activación de STAT1 por IFN- γ también es dependiente del tiempo de actuación de la droga en el cultivo celular.

En el caso de fludarabina, en aquellas LLC-B en la que produce la inhibición de la activación de STAT1 por IFN- γ , se necesita del orden de 24 horas para producir dicho efecto (Figura R6.a.). La inhibición de la activación de STAT1, en el caso de, AG490 y WHI-P131, es más variable en el tiempo. En algunos casos, se necesitan 24 horas para que AG490 y WHI-P131 inhiban la activación de STAT1 (Figura R6.b. y c respectivamente) mientras que en otros, tal y como se amplía en la sección 4 de RESULTADOS, la inhibición de la activación de STAT1 por IFN- γ puede producirse tras 45 minutos de tratamiento.



Nº Carril	a : LLC 7A	b : LLC 34A	c : LLC 40A
1	Control	Control	Control
2	IFN- γ 100 U/ml	IFN- γ 100 U/ml	IFN- γ 100 U/ml
3	Fudarabina 50 μ M 24 horas	AG490 170 μ M 24 horas	WHI-P131 170 μ M 24 horas
4	Fudarabina 50 μ M 24horas + IFN- γ 100 U/ml	AG490 170 μ M 24 horas + IFN- γ 100 U/ml	WHI-P131 170 μ M 24 horas + IFN- γ 100 U/ml
5	Fudarabina 50 μ M 6 horas	AG490 170 μ M 6 horas	WHI-P131 170 μ M 6 horas
6	Fudarabina 50 μ M 6 horas + IFN- γ 100 U/ml	AG490 170 μ M 6 horas + IFN- γ 100 U/ml	WHI-P131 170 μ M 6 horas + IFN- γ 100 U/ml
7	Fudarabina 50 μ M 45 minutos	AG490 170 μ M 45 minutos	WHI-P131 170 μ M 45 minutos
8	Fudarabina 50 μ M 45 minutos + IFN- γ 100 U/ml	AG490 170 μ M 45 minutos + IFN- γ 100 U/ml	WHI-P131 170 μ M 45 minutos + IFN- γ 100 U/ml

Figura R6. Efecto tiempo dependiente en la inhibición de la activación de STAT1 inducida por las drogas en tres leucemias representativas. Se analiza mediante EMSA la formación de homodímeros activados de STAT1 en la LLC 7A (fludarabina 50 μ M), LLC 34A (AG490 170 μ M), LLC 40A (WHI-P131 170 μ M) a las 1, 6 y 24 horas de tratamiento con las distintas drogas. Se observa que la inhibición de la activación de STAT1 inducida por las drogas va aumentando con el tiempo de tratamiento.

RESULTADOS

A la vista de los datos obtenidos para las tres drogas en la apoptosis inducida por las mismas, en el resto del estudio se muestran los datos de muerte celular tras 72 horas de tratamiento. En cuanto al estudio de la inhibición de la activación de STAT1, los datos que se muestran en el resto del estudio son los correspondientes a los tratamientos durante 45 minutos y 24 horas.

3. CORRELACION ENTRE EL MARCAJE CON ANEXINA V Y LOS CAMBIOS MORFOLOGICOS DE LAS CELULAS TUMORALES DE LLC-B EN LA CITOMETRIA DE FLUJO

En el análisis de la viabilidad de las células tumorales de los pacientes con LLC-B se observa que las células apoptóticas además de marcarse positivamente para anexina V, sufren cambios en su morfología (Figura R7.).

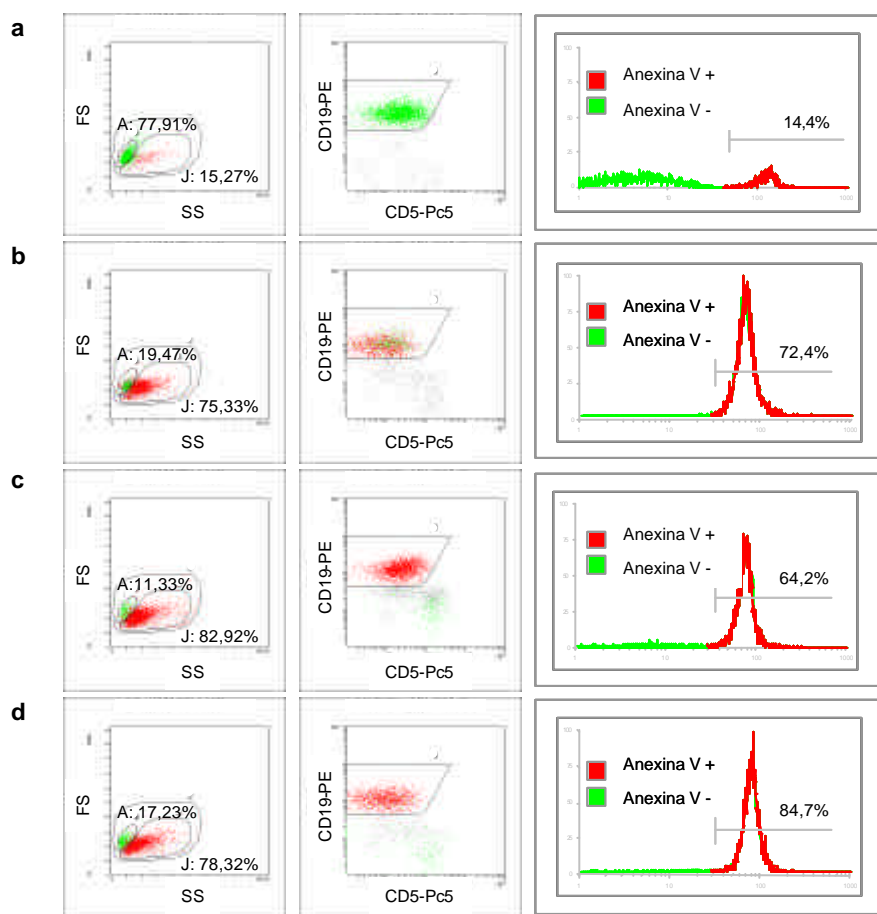


Figura R7. Las células CD19+/CD5+ anexina V+ sufren cambios morfológicos. Cuando en la citometría de flujo en una leucemia representativa (LLC 27B) se selecciona el pico de positividad para anexina V (rojo) se observa que las células positivas constituyen un núcleo de células más pequeñas y más irregulares que las células anexina V negativas (verde) en el histograma de morfología. Estos cambios morfológicos se observan tanto en las células sin tratar (a), como en las células tratadas con fludarabina 50 μ M (b), con AG490 170 μ M (c) y con WHI-P131 170 μ M (d) durante 72 horas.

RESULTADOS

Cuando se acota por una parte la población tumoral CD19+/CD5+ que se marca positivamente para anexina V (Figura R7., en rojo) y por otra la población no apoptótica (Figura R7., en verde) y se comprueba donde se sitúan ambas subpoblaciones en el histograma de morfología, se observa que aparecen dos núcleos celulares bien diferenciados. Por una parte, una población homogénea que corresponde a las células tumorales no apoptóticas (Figura R7., ventana A) y por otra, un núcleo de células con un tamaño más variable (FS) y de morfología mucho más irregular (SS) (Figura R7., ventana J). Estos cambios morfológicos se pueden observar tanto en las células sin tratar como en las tratadas con fludarabina, AG490 o WHI-P131.

Cuando se analiza la correlación entre el marcaje con anexina V de las células tumorales de los pacientes con LLC-B y los cambios morfológicos que sufren las mismas cuando entran en apoptosis, se comprueba que ambos parámetros se correlacionan entre sí. En la Figura R8 se muestran los gráficos de correlación entre el marcaje con anexina V y los cambios morfológicos que sufren las células situadas dentro de la ventana J cuando se analizan todas las LLC-B incluidas en el trabajo sin tratar con ninguna droga (**a**: control), y cuando se realizan tratamientos con distintas drogas (**b**: fludarabina 50 μ M; **c**: AG490 170 μ M; **d**: WHI-P131 170 μ M).

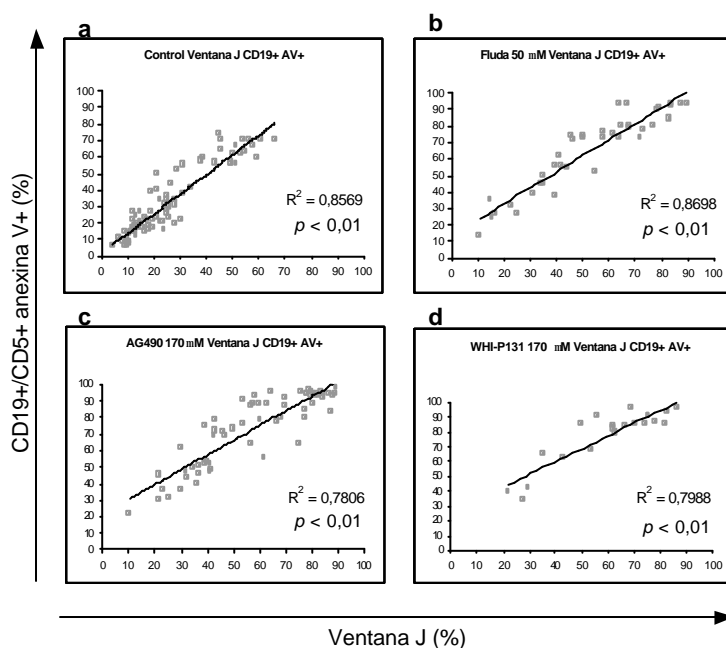


Figura R8. Correlación entre el marcaje con anexina V y los cambios morfológicos en el conjunto de las leucemias. Representación gráfica de la correlación entre el porcentaje de células CD19+/CD5+ anexina V+ y el porcentaje de células incluidas en la ventana J en el conjunto de las LLC-B. La correlación se observa tanto en las células sin tratar (**a**), como en las células tratadas con fludarabina 50 μ M (**b**), con AG490 170 μ M (**c**) y con WHI-P131 170 μ M (**d**) durante 72 horas.

RESULTADOS

Esta correlación entre los cambios morfológicos de las células de la ventana J y el marcaje de anexina V se mantiene cuando se valora tanto en función de los tratamientos con las distintas drogas y dosis que se ha empleado en este trabajo (fludarabina 5 μ M, AG490 85 μ M, WHI-P131 85 μ M y DMSO 10 μ g/ml), como en función de los tiempos a los que se ha analizado la apoptosis de las células leucémicas (24, 48 y 72 horas) (Tabla R3).

Tabla R3. Correlación entre anexina V y cambios morfológicos.

Drogas	R2	p
Fludarabina 5 μ M	0,9141	<0,0001
AG490 85 μ M	0,7811	<0,0001
WHI-P131 85 μ M	0,8451	<0,0001
DMSO 10 μ g/ml	0,836	<0,0001

Tiempos	R2	p
24 horas	0,7852	<0,0001
48 horas	0,8946	<0,0001
72 horas	0,8827	<0,0001

Tras comprobar que en el análisis por citometría de flujo existe una buena correlación entre el marcaje con anexina V de las células apoptóticas de pacientes con LLC-B y los cambios morfológicos que estas células sufren cuando entran en apoptosis, se han empleado como medidores de la apoptosis celular indistintamente la alteración en la morfología de las células leucémicas apoptóticas (ventana J) como el marcaje con anexina V.

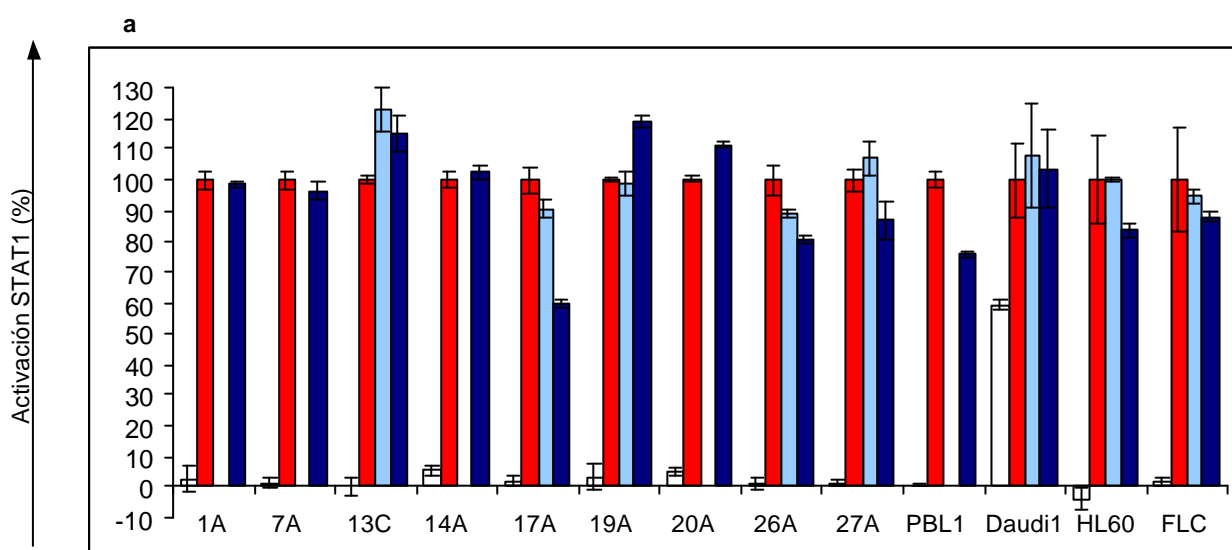
Por otra parte, en aquellas LLC-B en las que se ha analizado más de una muestra, los datos del estudio de apoptosis inducida por las distintas drogas tras 72 horas de tratamiento son concordantes entre las distintas muestras de una misma LLC-B.

RESULTADOS

4. TRATAMIENTOS *IN VITRO* DE 45 MINUTOS CON FLUDARABINA E INHIBIDORES DE JAK KINASAS DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE LLC-B. VALORACION DE LA INHIBICION DE LA ACTIVACION DE STAT1 Y DE LA APOPTOSIS CELULAR

4.1. Tratamiento *in vitro* de 45 minutos con fludarabina

Analizamos el efecto que la fludarabina y otras drogas tiene sobre la activación de STAT1 tras 45 minutos de tratamiento *in vitro* en los cultivos de células mononucleares de 9 pacientes con LLC-B así como en un control sano (PBL1) y en las líneas celulares humanas *Daudi* y HL60 y en la murina FLC (Figura R9.).



b

Tratamiento	Nº muestras	media (%)	rango (%)	<i>p</i>
Fludarabina 5 μ M	5	-1,70	-22,75 10,63	0,8892
Fludarabina 50 μ M	9	3,31	-15,03 40,40	0,9289

Figura R9. Efecto de la fludarabina en la activación de STAT1 en las células LLC-B. EMSA de 9 LLC-B, un control sano y líneas celulares (*Daudi*, HL60 y FLC) tratadas con fludarabina 5 μ M (azul claro) o 50 μ M (azul oscuro) durante 45 minutos (**a**). Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos realizados a cada muestra. El extracto de las células LLC-B activadas con IFN- γ (rojo) se considera como control positivo de la activación de STAT1 tomándose su valor como el cien por cien de la activación. Media, rango y significación del conjunto de LLC-B tratadas con fludarabina 5 μ M y 50 μ M (**b**).

El tratamiento con fludarabina 5 μ M (Figura R9.a.: barras azul claro) no produce inhibición significativa de la activación STAT1 en ninguna de las 5 LLC-B tratadas

RESULTADOS

(Figura R9.b.). Con el tratamiento con fludarabina 50 μ M (Figura R9.a.: barra azul oscuro) sólo se observa una mínima inhibición de la activación de STAT1 en el conjunto de las 9 LLC-B tratadas (Figura R9.b.). La LLC 17A es la muestra en que se observa una mayor disminución de la activación de STAT1 tras el tratamiento con fludarabina 50 μ M, pero esta inhibición no es estadísticamente significativa respecto a su control de activación ($p=0,0862$). En el control sano y en las líneas celulares tampoco se observa una disminución significativa de STAT1 tras la activación con IFN- γ .

Las células control de la línea celular humana *Daudi* que no ha recibido estimulación con IFN- γ dan una señal positiva *per se*. Puede que sea debido a una activación constitutiva de STAT1.

Cuando se analiza la viabilidad de las LLC-B, el control sano y las líneas celulares mediante citometría de flujo, se observa en todas ellas que tras 72 horas de tratamiento con fludarabina, los porcentajes de apoptosis son elevados sobre todo a la dosis de 50 μ M siendo más variables entre las distintas leucemias con la dosis de 5 μ M (Tabla R4.a.). En el conjunto de las LLC-B, la apoptosis inducida con ambas dosis de fludarabina, resulta significativa respecto a los controles (Tabla R4.b.).

Tabla R4. Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con fludarabina.

a	Id pacientes	Ventana J (%)		
		CONTROL	Fludarabina 5 μ M	Fludarabina 50 μ M
	LLC 1A	32,29	-	81,93
	LLC 7A	29,27	-	89,34
	LLC 13C	38,87	61,17	87,55
	LLC 14A	33,83	-	99,45
	LLC 17A	31,85	83,10	93,69
	LLC 19A	23,35	69,84	85,10
	LLC 20A	24,97	-	93,23
	LLC 26A	19,69	58,98	80,17
	LLC 27A	16,46	63,05	88,25
	PBL 1	25,83	-	83,55
	Daudi 1	37,08	63,54	89,93
	HL60	41,42	59,63	78,71
	FLC	30,88	55,87	97,76

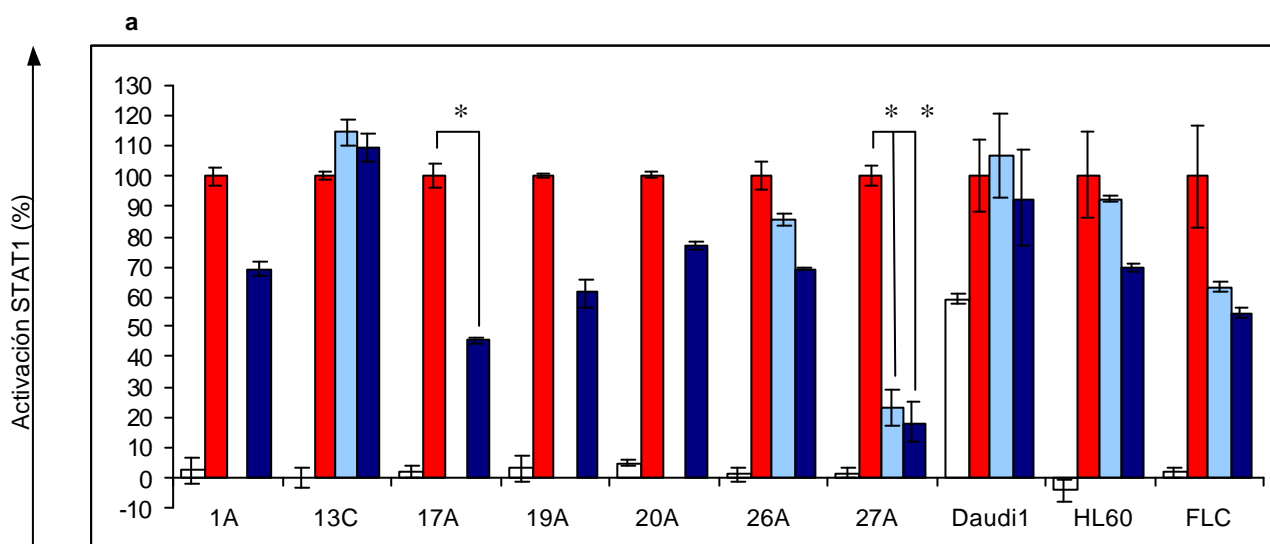
b	Tratamiento	Nº muestras	media (%)	p
	Fludarabina 5 μ M	5	67,23	0,0001
	Fludarabina 50 μ M	9	88,72	<0,0001

RESULTADOS

Al analizar la correlación entre la inhibición de la activación de STAT1 inducida por el tratamiento con fludarabina durante 45 minutos y la apoptosis inducida por la misma, se observa que con ninguna de las dos dosis empleadas existe correlación (fludarabina 5 μM : $R^2=0,2540$, $p=0,386$; fludarabina 50 μM : $R^2=0,0070$, $p=0,893$).

4.2. Tratamiento *in vitro* de 45 minutos con AG490

Para seguir analizando el papel que la inhibición de la vía de señalización de STAT1 puede jugar en la entrada en apoptosis de las células de LLC-B, se realiza el tratamiento con AG490, una molécula de la familia de las tirfostinas capaces de inhibir tirosina kinasas (Figura R10.).



b

Tratamiento	Nº muestras	media (%)	rango (%)	p
AG490 85 μM	3	25,62	-14,15 76,53	0,7414
AG490 170 μM	7	35,76	-9,35 81,44	0,3112

Figura R10. Efecto del AG490 en la activación de STAT1 en las células LLC-B. EMSA de 7 LLC-B y 3 líneas celulares (*Daudi*, HL60 y FLC) tratadas con AG490 85 μM (azul claro) o 170 μM (azul oscuro) durante 45 minutos (**a**). Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos realizados a cada muestra. El extracto de las células LLC-B activadas con IFN- γ (rojo) se considera como control positivo de la activación de STAT1 tomándose su valor como el cien por cien de la activación. Media, rango y significación del conjunto de LLC-B tratadas con AG490 85 μM y 170 μM (**b**).

* Descenso significativo en la activación de STAT1 en las muestras tratadas con AG490 comparado con el valor del control de activación con una $p<0,05$.

RESULTADOS

Las dosis empleadas son 85 μM (Figura R10.a.: barra azul claro) y 170 μM (Figura R10.a.: barra azul oscuro). En dos de las leucemias la inhibición de STAT1 con la dosis más alta es significativa (LLC 17A $p=0,0172$; LLC 27A $p=0,0410$) siendo además significativa con la dosis de 85 μM en la LLC 27A ($p=0,0360$). En el conjunto de las LLC-B tratadas con AG490, se observa un mayor inhibición de la señal de STAT1 que con el tratamiento con fludarabina aunque no llega a ser significativa (Figura R10.b.).

En cuanto a las líneas celulares, la disminución de la señal STAT1 de las células tratadas con la tirfostina AG490 fue mayor que con el tratamiento con fludarabina en HL60 y FLC sobre todo con la dosis más alta, mientras que en *Daudi* apenas se observa inhibición con ninguna de las dos dosis. En ningún caso la inhibición fue significativa.

Cuando se analiza la viabilidad celular tras 72h de tratamiento con la tirfostina AG490, todas las células LLC-B, el control sano y las líneas celulares presentan un elevado porcentaje de apoptosis inducida con ambas dosis. En el conjunto de las LLC-B, la apoptosis con ambas dosis de AG490, resulta significativa respecto a los controles (Tabla R5.b.).

Tabla R5. Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con AG490.

a	Id	Ventana J (%)		
		DMSO 10 mg/ml	AG490 85 mM	AG490 170 mM
	LLC 1A	19,05	-	76,11
	LLC 13C	33,27	88,98	93,89
	LLC 17A	26,24	-	99,99
	LLC 19A	17,39	-	76,91
	LLC 20A	26,45	-	82,45
	LLC 26A	7,51	64,15	64,89
	LLC 27A	18,24	85,90	90,39
	Daudi 1	50,20	96,18	98,67
	HL60	50,10	68,68	91,88
	FLC	37,15	95,78	99,84

b	Tratamiento	Nº muestras	media (%)	p
	AG490 85 μM	3	82,03	0,0065
	AG490 170 μM	7	84,18	<0,0001

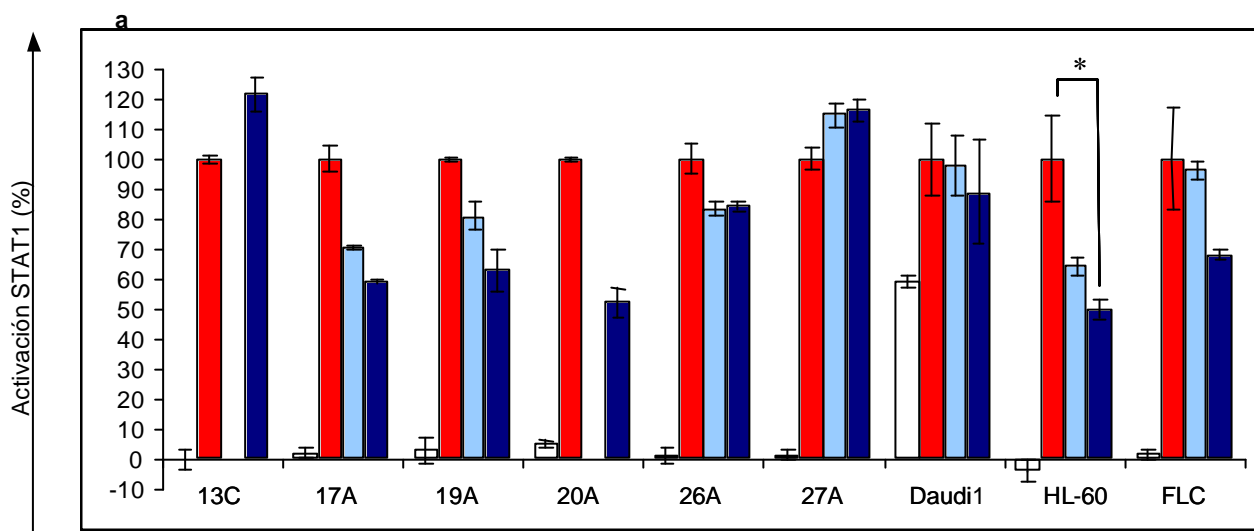
En el análisis la correlación entre la inhibición de la activación de STAT1 inducida por el tratamiento con AG490 durante 45 minutos y la apoptosis inducida

RESULTADOS

por esta tirfostina, se observa que con ninguna de las dos dosis empleadas existe correlación (AG490 85 μM : $R^2=0,10958$, $p=0,785$; AG490 170 μM : $R^2=0,0533$, $p=0,618$).

4.3. Tratamiento *in vitro* de 45 minutos con WHI-P131

En el tratamiento durante 45 minutos con un tirfostina WHI-P131 descrita como un inhibidor selectivo de JAK3 y sin efecto sobre JAK1 ni JAK2, se observa una disparidad en el comportamiento de los extractos de las distintas leucemias en lo que se refiere a la inhibición de la activación de STAT1 (Figura R11.).



b

Tratamiento	Nº muestras	media (%)	rango (%)	<i>p</i>
WHI-P131 85 μM	4	12,63	-14,72 29,48	0,8460
WHI-P131 170 μM	6	17,13	-21,83 47,80	0,7847

Figura R11. Efecto del WHI-P131 en la activación de STAT1 en las células LLC-B. EMSA de 6 LLC-B y 3 líneas celulares (*Daudi*, HL60 y FLC) tratadas con WHI-P131 85 μM (azul claro) o 170 μM (azul oscuro) durante 45 minutos **(a)**. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos realizados a cada muestra. El extracto de las células LLC-B activadas con IFN- γ (rojo) se considera como control positivo de la activación de STAT1 tomándose su valor como el cien por cien de la activación. Media, rango y significación del conjunto de LLC-B tratadas con WHI-P131 85 μM y 170 μM **(b)**.

* Descenso significativo en la activación de STAT1 en las muestras tratadas con WHI-P131 comparado con el valor del control de activación con una $p < 0,05$.

RESULTADOS

En una de las leucemias (Figura R11.a.: LLC 20A) se produce una cierta inhibición de la activación de STAT1 tras el estímulo con IFN- γ con el tratamiento con WHI-P131 a la dosis de 170 μ M (Figura R11.a.: barra azul oscuro) aunque no llega a ser significativa ($p=0,0647$).

En el conjunto de las LLC-B tratadas con WHI-P131 tras 45 minutos se observa un escasa inhibición de la señal de STAT1 que no llega a ser significativa con ninguna de las dos dosis empleadas (Figura R11.b.).

Con respecto a las líneas celulares, en la línea HL60 se observa una importante inhibición de STAT1 a las dos dosis WHI-P131 siendo significativa con la dosis de 170 μ M ($p=0,0335$). Esta inhibición es menor en FLC y no se observa en *Daudi*.

Cuando se analiza la apoptosis celular tras 72 horas de tratamiento con WHI-P131, se observa que mientras a la dosis de 170 μ M tanto las LLC-B como el control sano y las líneas celulares presentan elevados porcentajes de apoptosis, a la dosis de 85 μ M los porcentajes son más bajos excepto en la línea celular *Daudi* que resulta ser muy sensible al tratamiento con WHI-P131 a esta dosis (Tabla R6.a.). La apoptosis en el conjunto de las LLC-B tratadas con ambas dosis de WHI-P131 resultan significativas respecto a la apoptosis de sus controles (Tabla R6.b.)

Tabla R6. Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con WHI-P131.

a	Id	Ventana J (%)		
		DMSO 10 mg/ml	WHI-P131 85 mM	WHI-P131 170 mM
	LLC 13C	33,27	-	91,29
	LLC 17A	26,24	54,91	92,07
	LLC 19A	17,39	46,99	88,44
	LLC 20A	26,45	-	91,73
	LLC 26A	7,51	19,68	75,98
	LLC 27A	18,24	34,98	87,96
	Daudi 1	50,20	64,89	81,30
	HL60	50,10	72,42	93,93
	FLC	37,15	74,76	96,59

b	Tratamiento	Nº muestras	media (%)	p
	WHI-P131 85 μ M	4	39,14	0,0582
	WHI-P131 170 μ M	6	87,91	<0,0001

Al analizar la correlación entre la inhibición de la activación de STAT1 inducida por el tratamiento con WHI-P131 durante 45 minutos y la apoptosis inducida por esta droga, se observa que con ninguna de las dos dosis empleadas existe

RESULTADOS

correlación (WHI-P131 85 μM : $R^2=0,1600$, $p=0,600$; WHI-P131 170 μM : $R^2=0,0144$, $p=0,820$).

4.4. Tratamiento *in vitro* de 45 minutos con AG555 y AG494

Los tratamientos a 45 minutos se completaron con el empleo de otras drogas como son las moléculas de la familia de las tirfostinas AG555 y AG494 (Figura R12.).

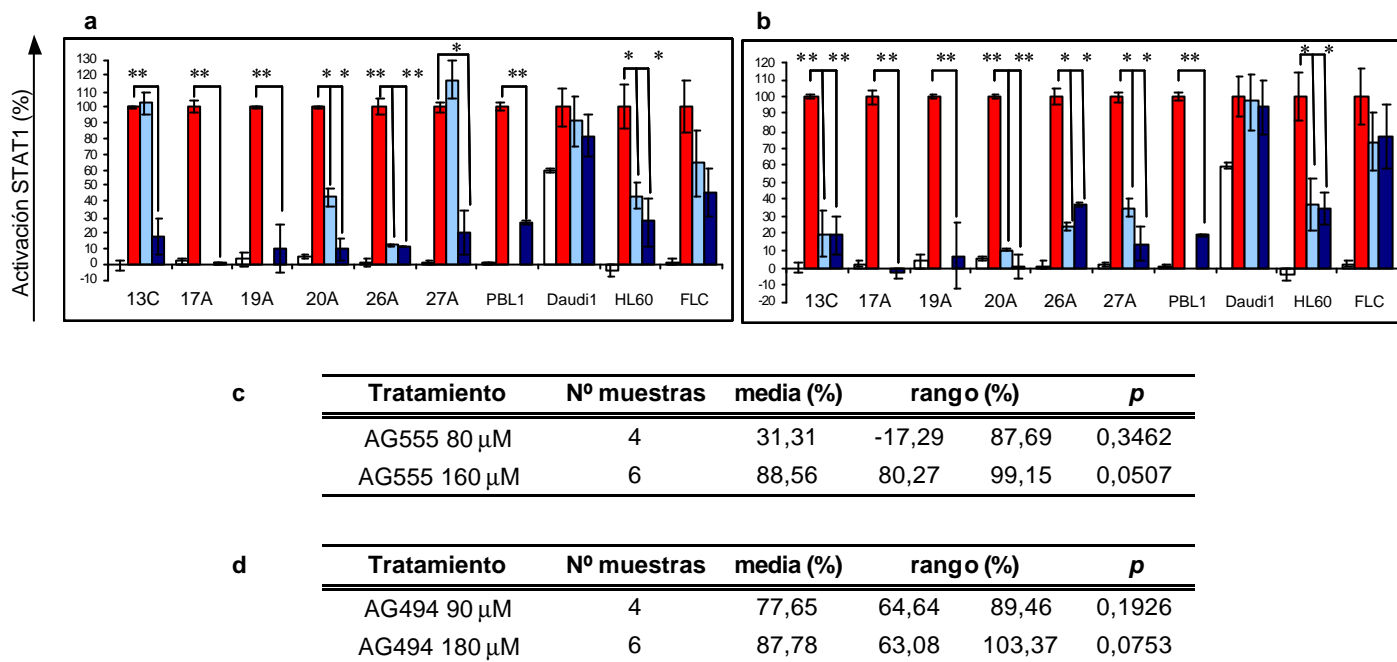


Figura R12. Efecto del AG555 y el AG494 en la activación de STAT1 en las células LLC-B. EMSA de 6 LLC-B, un control sano y líneas celulares (*Daudi*, HL60 y FLC) tratadas con AG555 80 μM (azul claro) o 160 μM (azul oscuro) durante 45 minutos (**a**). EMSA de 6 LLC-B, un control sano y 3 líneas celulares (*Daudi*, HL60 y FLC) tratadas con AG494 90 μM (azul claro) o 180 μM (azul oscuro) durante 45 minutos (**b**). Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos realizados a cada muestra. El extracto de las células LLC-B activadas con IFN- γ (rojo) se considera como control positivo de la activación de STAT1 tomándose su valor como el cien por cien de la activación. Media, rango y significación del conjunto de LLC-B tratadas con AG555 80 μM y 160 μM (**c**) y con AG494 90 μM y 180 μM (**d**).

* Descenso significativo en la activación de STAT1 en las muestras tratadas con AG555 y AG494 comparado con el valor del control de activación con una $p < 0,05$. ** Descenso significativo en la activación de STAT1 en las muestras tratadas con AG555 y AG494 comparado con el valor del control de activación con una $p < 0,01$.

Ambas moléculas a las concentraciones más altas empleadas (AG555 160 μM , AG494 180 μM) son capaces de inhibir significativamente la formación de

RESULTADOS

homodímeros activados de STAT1 tras el estímulo de IFN- γ en las 6 LLC-B después de 45 minutos de tratamiento (Figura R12.a. y b.). En cuanto al tratamiento con AG555 a la dosis de 80 μ M, se observa una inhibición en 2 de las 4 LLC-B tratadas (LLC 20A $p=0,0433$; LLC 26A $p=0,0118$), mientras que con AG494 90 μ M se produce una inhibición de STAT1 en las 4 LLC-B tratadas (Figura R12.b.).

En el conjunto de las LLC-B tratadas con AG555 y con AG494 a las dos dosis se observa una importante inhibición de la señal de STAT1 a pesar de que no llega a ser significativa con ninguna de las dos dosis (Figura R12.c. y d.).

El control sano presenta una inhibición de la activación de STAT1 tanto con AG555 como con AG494. En cuanto a las líneas celulares, tanto en *Daudi* como FLC no se produce inhibición de STAT1 ni con AG555 ni con AG494. HL60 resulta más sensible a las dos tirfostinas observándose una inhibición significativa con las dos drogas y a las dos dosis.

En cuanto a la viabilidad de los cultivos tratados con AG555 y AG494, se observa que a las dos dosis todas las leucemias presentan elevados porcentajes de apoptosis tras 72 horas de tratamiento sobre todo con las más altas (Tabla R7.a.). La apoptosis producida en el conjunto de las LLC-B por las dos drogas y a las dos dosis resultan estadísticamente significativas (Tabla R7.b.)

Tabla R7. Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con AG555 y AG494.

a	Id pacientes	Ventana J (%)				
		DMSO 10 mg/ml	AG 555 80 mM	AG 555 160 mM	AG 494 90 mM	AG 494 180 mM
	LLC 13C	33,27	95,49	97,09	90,30	95,39
	LLC 17A	26,24	-	94,44	-	95,22
	LLC 19A	17,39	-	89,09	-	88,32
	LLC 20A	26,45	85,10	95,51	78,79	91,49
	LLC 26A	7,51	40,35	95,21	41,42	97,26
	LLC 27A	18,24	65,52	87,64	72,38	94,88
	PBL 1	28,15	-	94,49	-	93,15
	Daudi 1	50,20	97,67	99,99	99,22	99,90
	HL60	50,10	84,48	89,82	60,54	71,86
	FLC	37,15	99,94	99,93	99,93	99,91

b	Tratamiento	Nº muestras	media (%)	p
	AG555 80 μ M	4	77,15	0,0139
	AG 555 160 μ M	6	89,48	<0,0001
	AG494 90 μ M	4	70,72	0,0105
	AG494 180 μ M	6	93,76	<0,0001

RESULTADOS

En cuanto a las líneas celulares *Daudi* y FLC son muy sensibles a los tratamientos tanto con AG555 como con AG494 de manera que la mayor parte de sus células están apoptóticas tras 72 horas de exposición a la respectiva droga. Precisamente la línea celular HL60 que es en la única en que existe inhibición de STAT1, es la que presenta los porcentajes más bajos de apoptosis con las dos drogas.

Cuando se analiza la correlación entre la inhibición de la activación de STAT1 inducida por el tratamiento con AG555 y AG494 durante 45 minutos y la apoptosis inducida por estas tirfostinas, se observa que con ninguna de las dos drogas y con ninguna de las dosis empleadas existe correlación (AG555 80 μM : $R^2=0,6674$, $p=0,817$; AG555 160 μM : $R^2=0,2872$, $p=0,273$; AG494 90 μM : $R^2=0,0033$, $p=0,942$; AG494 180 μM : $R^2=0,3124$, $p=0,249$).

5. TRATAMIENTOS *IN VITRO* DE 24 HORAS CON FLUDARABINA E INHIBIDORES DE JAK KINASAS DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE LLC-B. VALORACION DE LA INHIBICION DE LA ACTIVACION DE STAT1 Y DE LA APOPTOSIS CELULAR

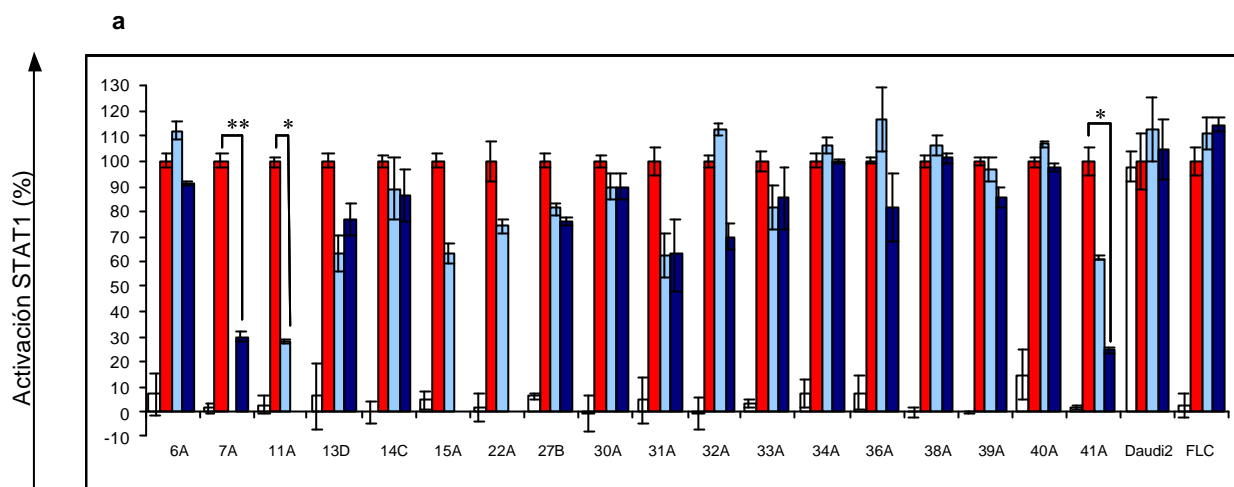
5.1. Tratamiento *in vitro* de 24 horas con fludarabina

Tal y como se ha visto en el apartado 4.1. de RESULTADOS, si la fludarabina ejerce algún efecto inhibitorio en la vía de activación de STAT1 por IFN- γ , necesita al menos 24 horas para producir dicha inhibición. Por este motivo, se realizan cultivos celulares en un grupo de 18 LLC-B con un tiempo de exposición a la droga de 24 horas (Figura R13.).

El tratamiento con fludarabina 5 μM (Figura R14.a.: barras azul claro) sólo produce inhibición significativa de STAT1 en una de las 17 LLC-B tratadas (LLC11A, $p=0,0154$). Con el tratamiento con fludarabina 50 μM (Figura R14.a.: barras azul oscuro) se observa una inhibición de STAT1 en dos de las 15 LLC-B tratadas (LLC7A, $p=0,0070$; LLC41A, $p=0,0428$).

En el conjunto de las LLC-B tratadas no se observa un descenso significativo de la activación de STAT1 con ninguna de las dos dosis empleadas (Figura R14.b.).

RESULTADOS



b

Tratamiento	Nº muestras	media (%)	rango (%)		p
Fludarabina 5 μ M	17	14,56	-12,78	72,08	0,2454
Fludarabina 50 μ M	15	22,65	-1,11	75,20	0,2794

Figura R13. Efecto de la fludarabina en la activación de STAT1 en las células LLC-B. EMSA de 18 LLC-B y 2 líneas celulares (*Daudi* y FLC) tratadas con fludarabina 5 μ M (azul claro) o 50 μ M (azul oscuro) durante 24 horas (**a**). Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos realizados a cada muestra. El extracto de las células LLC-B activadas con IFN- γ (rojo) se considera como control positivo de la activación de STAT1 tomándose su valor como el cien por cien de la activación. Media, rango y significación del conjunto de LLC-B tratadas con fludarabina 5 μ M y 50 μ M (**b**).

* Descenso significativo en la activación de STAT1 en las muestras tratadas con fludarabina comparado con el valor del control de activación con una $p < 0,05$.

Respecto a las líneas celulares FLC y *Daudi* no se produce inhibición de STAT1 en ninguno de las dos líneas. Al igual que en los experimentos a 45 minutos (RESULTADOS sección 4), la línea celular *Daudi* presenta una activación basal de STAT1 en las células control no estimuladas con IFN- γ .

En el análisis de la viabilidad celular en las células LLC-B tratadas durante 72 horas con fludarabina (Tabla R8.a.), los porcentajes de células CD19+/CD5+ anexina V positivas son mucho más elevados que sus respectivos controles (Tabla R8.b.). En las líneas celulares tras 72 horas de tratamiento con fludarabina 5 μ M el porcentaje de apoptosis es bajo, mientras que a la dosis de 50 μ M los porcentajes de apoptosis que se observan son elevados (Tabla R8.c.).

RESULTADOS

Tabla R8. Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con fludarabina.

a

Id pacientes	Anexina V+ CD19+/CD5+		
	Control	Fludarabina 5 mM	Fludarabina 50 mM
LLC 6A	16,60	54,30	77,00
LLC 7A	25,20	-	80,40
LLC 11A	13,80	32,20	-
LLC 13D	30,90	46,50	77,50
LLC 14C	14,80	75,00	84,30
LLC 15A	22,30	78,50	-
LLC 22A	23,10	60,60	-
LLC 27B	14,40	46,60	72,40
LLC 30A	8,82	77,60	90,20
LLC 31A	31,80	66,80	80,30
LLC 32A	21,70	90,80	93,10
LLC 33A	21,30	81,80	92,90
LLC 34A	19,00	67,00	92,50
LLC 36A	18,70	27,70	44,50
LLC 38A	5,64	49,40	75,20
LLC 39A	19,40	41,60	61,40
LLC 40A	17,70	51,00	80,20
LLC 41A	23,60	48,60	65,90

b

Tratamiento	Nº muestras	media (%)	p
Fludarabina 5 µM	17	58,59	<0,0001
Fludarabina 50 µM	15	77,85	<0,0001

c

Id	Ventana J (%)		
	CONTROL	Fludarabina 5 mM	Fludarabina 50 mM
Daudi 2	49,30	61,41	88,27
FLC	30,88	55,87	97,76

Cuando se estudia la posible relación entre la inhibición de STAT1 y la entrada en apoptosis inducida por fludarabina de las células tumorales en el conjunto de LLC-B, no se observa correlación entre ambas con ninguna de las dos dosis de fludarabina empleadas (fludarabina 5 µM: $R^2=0,0172$, $p=0,616$; fludarabina 50 µM: $R^2=0,0287$, $p=0,546$).

5.2. Tratamiento *in vitro* de 24 horas con AG490

Continuando el estudio de la inhibición de la vía de activación de STAT1 se realiza en tratamiento con AG490 durante 24 horas (Figura R14.).

RESULTADOS

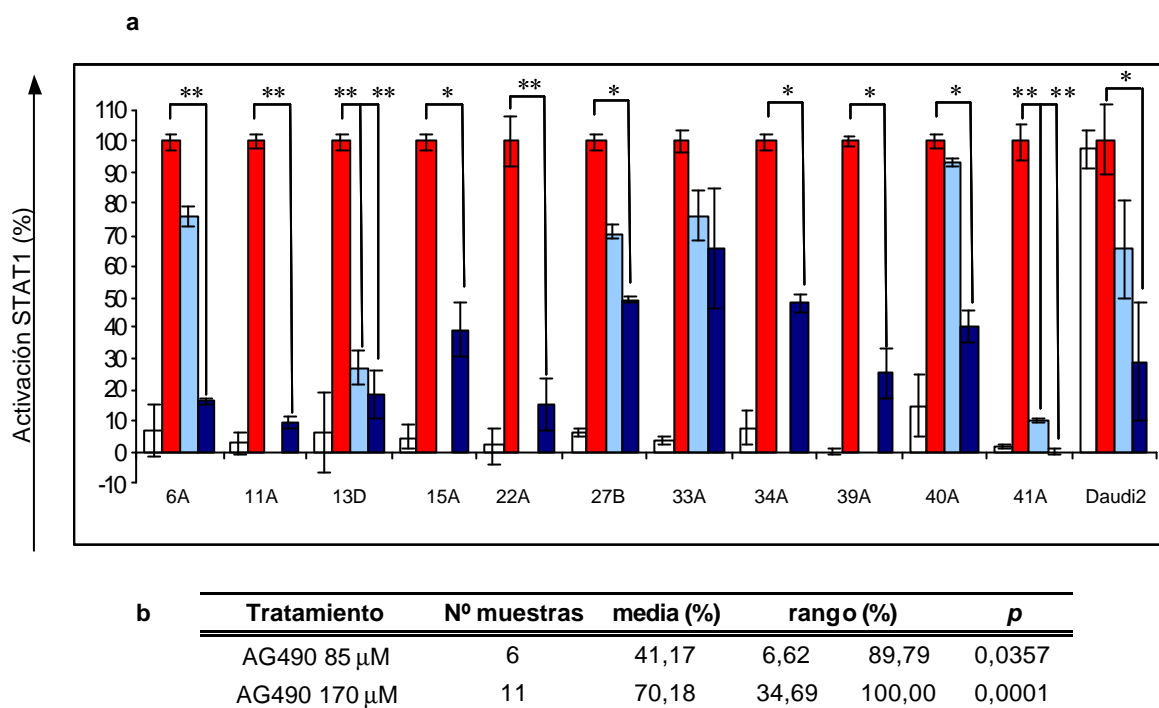


Figura R14. Efecto del AG490 en la activación de STAT1 en las células LLC-B. EMSA de 11 LLC-B, y la línea celular *Daudi* tratadas con AG490 85 μ M (azul claro) o 170 μ M (azul oscuro) durante 24 horas (a). Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos realizados a cada muestra. El extracto de las células LLC-B activadas con IFN- γ (rojo) se considera como control positivo de la activación de STAT1 tomándose su valor como el cien por cien de la activación. Media, rango y significación del conjunto de LLC-B tratadas con AG490 85 μ M y 170 μ M (b).

* Descenso significativo en la activación de STAT1 en las muestras tratadas con AG490 comparado con el valor del control de activación con una $p < 0,05$. ** Descenso significativo en la activación de STAT1 en las muestras tratadas con AG490 comparado con el valor del control de activación con una $p < 0,01$.

Tras 24 horas de exposición a la droga, se observa que con la dosis de 85 μ M (Figura R14.a.: barras azul claro) la inhibición de la activación de STAT1 es variable de modo que sólo en 2 de las 6 LLC-B se observa una inhibición significativa (LLC 13D $p = 0,0092$; LLC 41A $p = 0,0028$). Cuando se analiza la inhibición de la activación de STAT1 con la dosis más alta de AG490, el descenso de STAT1 resulta significativo en 10 de las 11 LLC-B tratadas (Figura R14.a.: barras azul oscuro).

En la línea celular *Daudi* la acción inhibitoria sobre la activación de STAT1 es significativa tras 24 horas de tratamiento con la dosis 170 μ M de AG490 ($p = 0,0215$).

RESULTADOS

Cuando analizamos en conjunto la inhibición de la activación de STAT1 en las LLC-B tratadas con AG490, se observa una inhibición significativa con las dos dosis de la droga empleadas (Figura R14.b.).

En el estudio de apoptosis tras el tratamiento durante 72 horas con AG490 (Tabla R9.a.) se observa que en todas las leucemias tratadas con AG490 170 μ M, el porcentaje de células anexina V positivas es muy elevado siendo estos porcentajes más variables cuando el tratamiento se realiza con una dosis de 85 μ M. Con ambas concentraciones de AG490, la apoptosis de las células CD19+/CD5+ resulta significativa respecto a sus respectivos controles (Tabla R9.b.).

La línea celular *Daudi* presenta unos porcentajes de células apoptóticas elevados tras 72 horas de tratamiento con AG490 tanto con la dosis de 85 μ M como con la de 170 μ M (Tabla R9.c.).

Tabla R9. Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con AG490.

a	Id pacientes	Anexina V+ CD19 +/CD5+		
		DMSO 10 mg/ml	AG 490 85 mM	AG 490 170 mM
	LLC 6A	18,90	28,60	52,70
	LLC 11A	39,30	-	95,30
	LLC 13D	40,00	95,70	95,30
	LLC 15A	26,30	-	92,20
	LLC 22A	36,10	-	80,00
	LLC 27B	17,50	46,20	64,20
	LLC 33A	12,50	57,10	96,50
	LLC 34A	22,80	-	96,50
	LLC 39A	28,10	-	87,10
	LLC 40A	22,90	83,50	93,50
	LLC 41A	18,50	68,00	74,50

b	Tratamiento	Nº muestras	media (%)	p
	AG490 85 μ M	6	63,18	0,0072
	AG490 170 μ M	11	84,35	<0,0001

c	Id	Ventana J (%)		
		DMSO 10 mg/ml	AG490 85 mM	AG490 170 mM
	Daudi 2	41,96	89,57	94,97

RESULTADOS

Cuando se estudia la posible relación entre la inhibición de la activación de STAT1 y la entrada en apoptosis inducidas por AG490 en el conjunto de LLC-B, no se observa correlación entre ambas con ninguna de las dos dosis de AG490 empleadas (AG490 85 μM : $R^2=0,1319$, $p=0,479$; AG490 170 μM : $R^2=0,0837$, $p=0,388$).

5.3. Tratamiento *in vitro* de 24 horas con WHI-P131

El estudio de la inhibición de la vía de activación de STAT1 se realiza en 7 LLC-B y en la línea celular *Daudi* tras tratarlas con WHI-P131 durante 24 horas (Figura R15.).

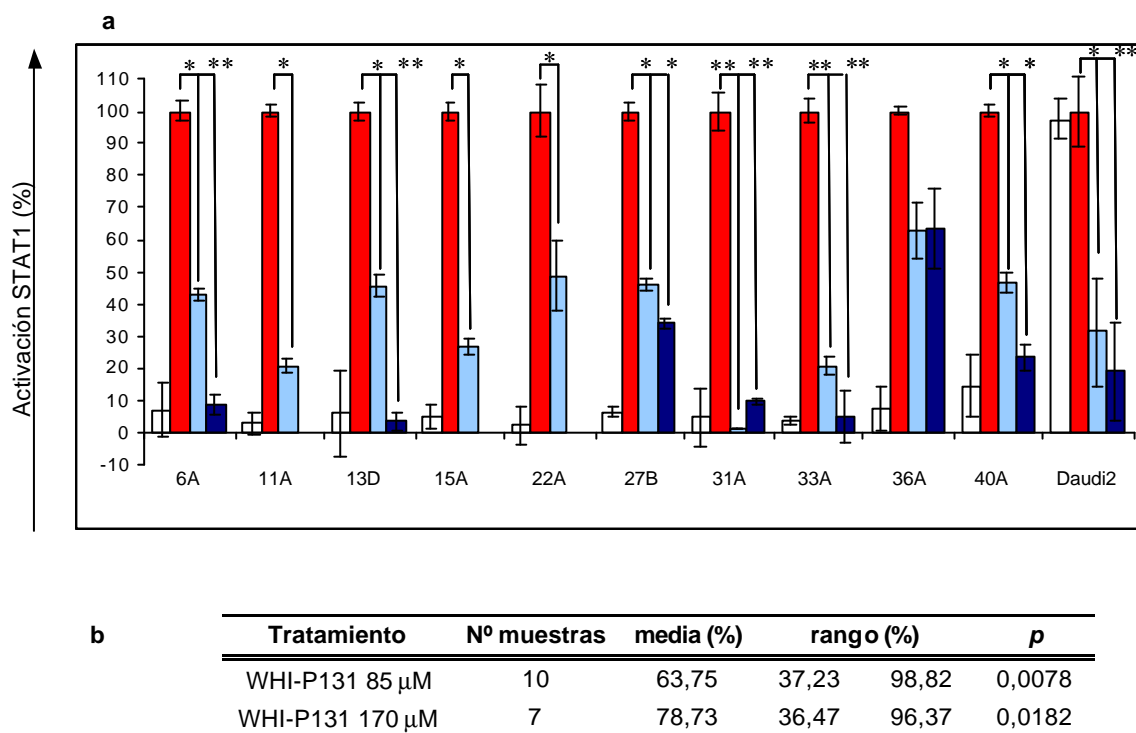


Figura R15. Efecto del WHI-P131 en la activación de STAT1 en las células LLC-B. EMSA de 11 LLC-B, y la línea celular *Daudi* tratadas con WHI-P131 85 μM (azul claro) o 170 μM (azul oscuro) durante 24 horas (**a**). Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos realizados a cada muestra. El extracto de las células LLC-B activadas con IFN- γ (rojo) se considera como control positivo de la activación de STAT1 tomándose su valor como el cien por cien de la activación. Media, rango y significación del conjunto de LLC-B tratadas con WHI-P131 85 μM y 170 μM (**b**).

* Descenso significativo en la activación de STAT1 en las muestras tratadas con WHI-P131 comparado con el valor del control de activación con una $p<0,05$. ** Descenso significativo en la activación de STAT1 en las muestras tratadas con WHI-P131 comparado con el valor del control de activación con una $p<0,01$.

RESULTADOS

Cuando se analiza la inhibición de la activación de STAT1 tras el tratamiento con el inhibidor de JAK3, WHI-P131, durante 24 horas, se observa que a la dosis de 170 μM (Figura R15.a.:barras azul oscuro) de las 7 LLC-B tratadas a esta dosis en todas excepto LLC 36A se produce una inhibición significativa en la activación de STAT1 respecto a sus controles activados con IFN- γ . Con el tratamiento con WHI-P131 a la dosis de 85 μM (Figura R15.a.:barras azul claro) de nuevo a excepción de LLC 36A en la que no se produce un descenso importante de la señal de los dímeros de STAT1 activado, en las otros 9 leucemias se produce inhibición significativa de la activación de STAT1.

En el conjunto de las LLC-B tratadas con WHI-P131 se observa una inhibición significativa de la activación de STAT1 a las dos dosis empleadas (Figura R15.b.).

En la línea celular *Daudi* se produce una importante inhibición de la activación de STAT1 por IFN- γ tras 24 horas de tratamiento con los dos dosis de WHI-P131 que se han utilizado.

Tabla R10. Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con WHI-P131.

a	Id pacientes	Anexina V+ CD19+/CD5+		
		DMSO 10 mg/ml	WHI-P131 85 mM	WHI-P131 170 mM
	LLC 6A	18,90	77,60	82,10
	LLC 11A	39,30	90,20	-
	LLC 13D	40,00	51,40	86,40
	LLC 15A	26,30	67,20	-
	LLC 22A	36,10	68,20	-
	LLC 27B	17,50	54,40	84,70
	LLC 31A	28,10	66,20	90,50
	LLC 33A	12,50	53,20	96,30
	LLC 36A	9,30	31,00	67,30
	LLC 40A	22,90	66,80	85,20

b	Tratamiento	Nº muestras	media (%)	p
	WHI-P131 85 μM	10	62,62	<0,0001
	WHI-P131 170 μM	7	84,64	<0,0001

c	Id	Ventana J (%)		
		DMSO 10 mg/ml	WHI-P131 85 mM	WHI-P131 170 mM
	Daudi 2	41,96	74,35	77,38

Al analizar la entrada en apoptosis de las células leucémicas tras 72 horas de tratamiento con WHI-P131 (Tabla R10.a.), se observa que en todos los casos el porcentaje de células CD19+/CD5+ que se marcan positivamente para anexina V

RESULTADOS

es muy elevado. La apoptosis inducida por WHI-P131 resulta significativa con ambas dosis (Tabla R10.b.).

La línea celular *Daudi* tras 72 horas de tratamiento con WHI-P131 también presenta unos porcentajes de apoptosis elevados (Tabla R10.c.).

Cuando se relacionan los dos parámetros, la inhibición de la activación de STAT1 tras 24 horas de tratamiento con WHI-P131 y la entrada en muerte celular a las 72 horas de exposición a esta droga se observa que a la dosis de 85 μM no existe correlación (WHI-P131 85 μM : $R^2=0,2252$, $p=0,166$). Sin embargo con el tratamiento con WHI-P131 a la dosis de 170 μM existe una correlación significativa entre la inhibición de la activación de STAT1 y la apoptosis inducida en las células CD19+/CD5+ tras 72 horas de tratamiento (WHI-P131 170 μM : $R^2=0,7163$, $p=0,016$).

5.4. Tratamiento *in vitro* de 24 horas con AG555 y AG494

El tratamiento con AG555 y AG494 durante 24 horas se realiza en tres y en una leucemia respectivamente, y en la línea celular *Daudi* utilizando la dosis más altas de las drogas. AG555 y AG494 inhiben significativamente la activación de STAT1 en las LLC-B tratadas. En la línea celular *Daudi*, mientras que AG555 sólo inhibe parcialmente la activación de STAT1, con AG494 se produce una inhibición significativa (Tabla R11.a. y b.).

Tabla R11. Inhibición de la activación de STAT1 tras 24 horas de tratamiento con AG555 y AG494.

a	Id	Control	IFN-g	AG555 160 mM
	pacientes		100 U/ml	+IFN-g 100 U/ml
	LLC 15A	1,85±6,41	100±2,77	-1,85±3,14 **
	LLC 22A	3,50±6,34	100±7,97	-3,14±0,85 **
	LLC 39A	-0,1±0,55	100±1,68	25,32±8,10 **
	Daudi 2	97,60±5,99	100±11,13	44,27±12,97

b	Id	Control	IFN-g	AG494 180 mM
	pacientes		100 U/ml	+ IFN-g 100 U/ml
	LLC 27B	6,39±1,60	100±2,84	9,96±1,24 *
	Daudi 2	97,60±5,99	100±11,13	17,83±11,16 *

* $p<0,05$. ** $p<0,01$.

RESULTADOS

Cuando se analiza la apoptosis inducida por AG555 y AG494 tras 72 horas de tratamiento, se observa que las dos drogas producen elevados porcentajes de apoptosis en todas las muestras tratadas así como en la línea celular *Daudi* (Tabla R12.a.-c.).

Tabla R12. Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con AG555 y AG494.

a	Id pacientes	Anexina V+	CD19+/CD5+
		DMSO 10 mg/ml	AG555 160 mM
	LLC 15A	26,30	91,30
	LLC 22A	36,10	80,20
	LLC 39A	28,10	94,50

b	Id pacientes	Anexina V +	CD19+/CD5+
		DMSO 10 mg/ml	AG494 180 mM
	LLC 27B	17,50	92,80

c	Daudi 2	
	Ventana J (%)	
	DMSO 10 mg/ml	AG555 160 mM
	41,96	96,77
	DMSO 10 mg/ml	AG494 180 mM
	41,96	97,00

6. AFECCION DE DIVERSAS PROTEINAS DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE LLC-B TRAS 24 HORAS DE TRATAMIENTO *IN VITRO* CON FLUDARABINA

Cuando se correlaciona la inhibición de la activación de STAT1 por IFN- γ en las LLC-B tras el tratamiento con fludarabina durante 24 horas y la entrada en apoptosis de las células leucémicas tras 72 horas de tratamiento con la droga, se observa que no existe correlación entre ambos parámetros. Esta ausencia de correlación se observa con las dos dosis de fludarabina empleadas en el estudio (Figura R16.).

RESULTADOS

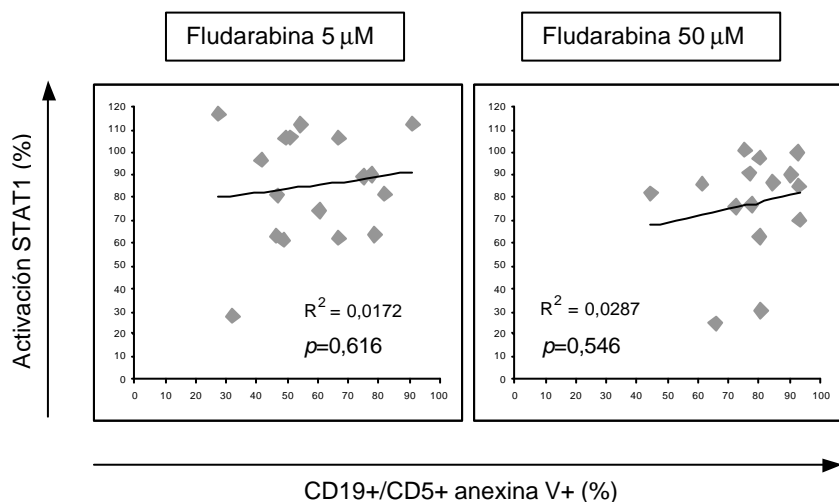


Figura R16. Correlación entre la activación de STAT1 y la apoptosis tras el tratamiento con fludarabina. No existe correlación entre la activación de STAT1 tras el tratamiento con fludarabina durante 24 horas y la apoptosis inducida por la droga tras 72 horas, tanto con la dosis de 5 μM como con la de 50 μM .

Este hecho hace pensar que la entrada en apoptosis de las células tumorales de LLC-B producida por fludarabina parece que no depende de la afectación exclusiva de STAT1 por parte de la droga, sino que fludarabina debe estar comprometiendo de una forma más global la homeostasis celular afectando a distintas proteínas celulares. Para analizar este aspecto, se realiza *Western-blot* de los extractos citoplasmáticos de las células mononucleares de LLC-B sin tratar y tratadas con fludarabina durante 24, 48 y 72 horas (Figura R17.).

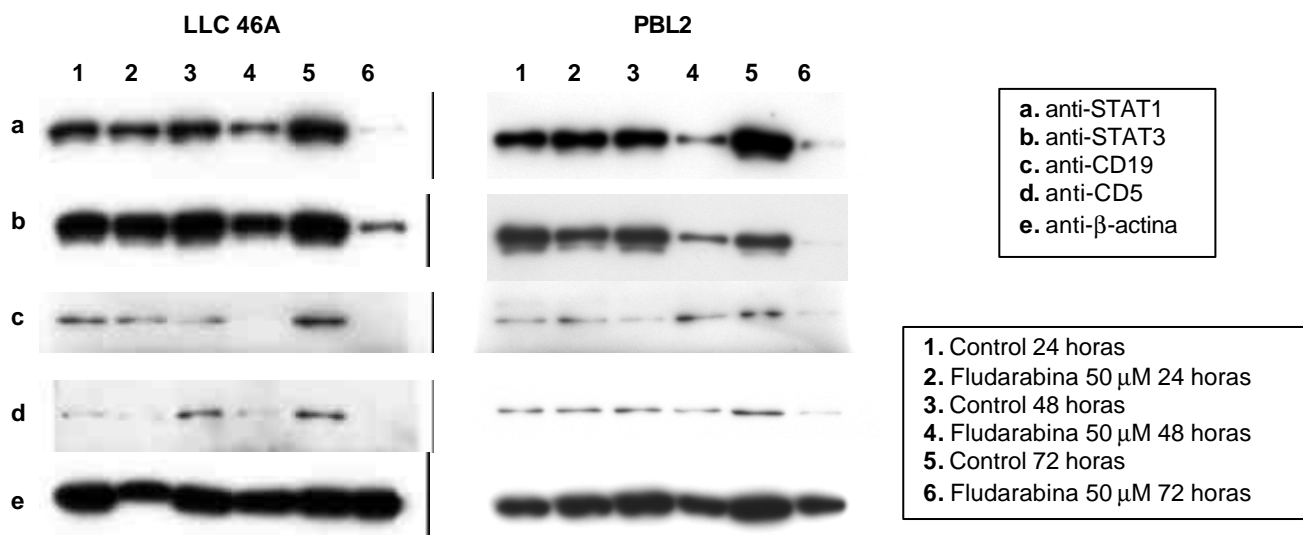


Figura R17. Afectación de distintas proteínas celulares tras el tratamiento con fludarabina. Cuando se analiza mediante *Western-blot* otras proteínas celulares como STAT3, CD19, CD5 además de STAT1 tras el tratamiento con fludarabina 50 μM se observa una disminución generalizada de las mismas a las 48 horas y sobre todo a las 72 horas de tratamiento.

RESULTADOS

En la Figura R17. se observa que además de STAT1, las proteínas STAT3, CD19, CD5 están afectadas por el tratamiento con fludarabina en los extractos de un control sano (PBL2) y de una leucemia representativa (LLC 46A).

La relación de los valores de la densitometría de cada una de las bandas reveladas por cada anticuerpo son referidas a la de su correspondiente control de anti- β -antina (Tabla R13.). Se observa que en todas las proteínas estudiadas en los extractos a 72 horas, y algunas ya a las 48 horas, hay un descenso en el extracto tratado con fludarabina 50 μ M respecto al extracto control a ese mismo tiempo.

Tabla R13. Densitometría del *Western-blot* de la LLC 46A y un control sano.

LLC 46A	anti-STAT1	anti-STAT3	anti-CD19	anti-CD5
Control 24 horas	0,651	1,000	0,148	0,039
Fludarabina 50 mM 24 horas	0,705	1,159	0,099	0,014
Control 48 horas	0,709	1,093	0,086	0,152
Fludarabina 50 mM 48 horas	0,530	0,966	0,010	0,060
Control 72 horas	0,758	1,055	0,221	0,164
Fludarabina 50 mM 72 horas	0,137	0,448	0,025	0,006
PBL2	anti-STAT1	anti-STAT3	anti-CD19	anti-CD5
Control 24 horas	0,846	0,830	0,063	0,171
Fludarabina 50 mM 24 horas	1,164	0,639	0,074	0,151
Control 48 horas	1,027	0,771	0,034	0,153
Fludarabina 50 mM 48 horas	0,720	0,301	0,090	0,107
Control 72 horas	1,467	0,641	0,119	0,215
Fludarabina 50 mM 72 horas	0,318	0,030	0,029	0,039

Para completar el estudio de la afectación global de proteínas en los extractos de células mononucleares de LLC-B tratadas con fludarabina 50 μ M se procede al análisis mediante electroforesis bidimensional de los extractos control y tratados durante 24 horas de cinco muestras distintas de un total de cuatro pacientes con LLC-B.

La Figura R19. muestra la electroforesis de los extractos de células mononucleares de una LLC-B representativa (LLC 42A) sin tratar (Figura R18.a.) y tratadas con fludarabina (Figura R89.b.).

RESULTADOS

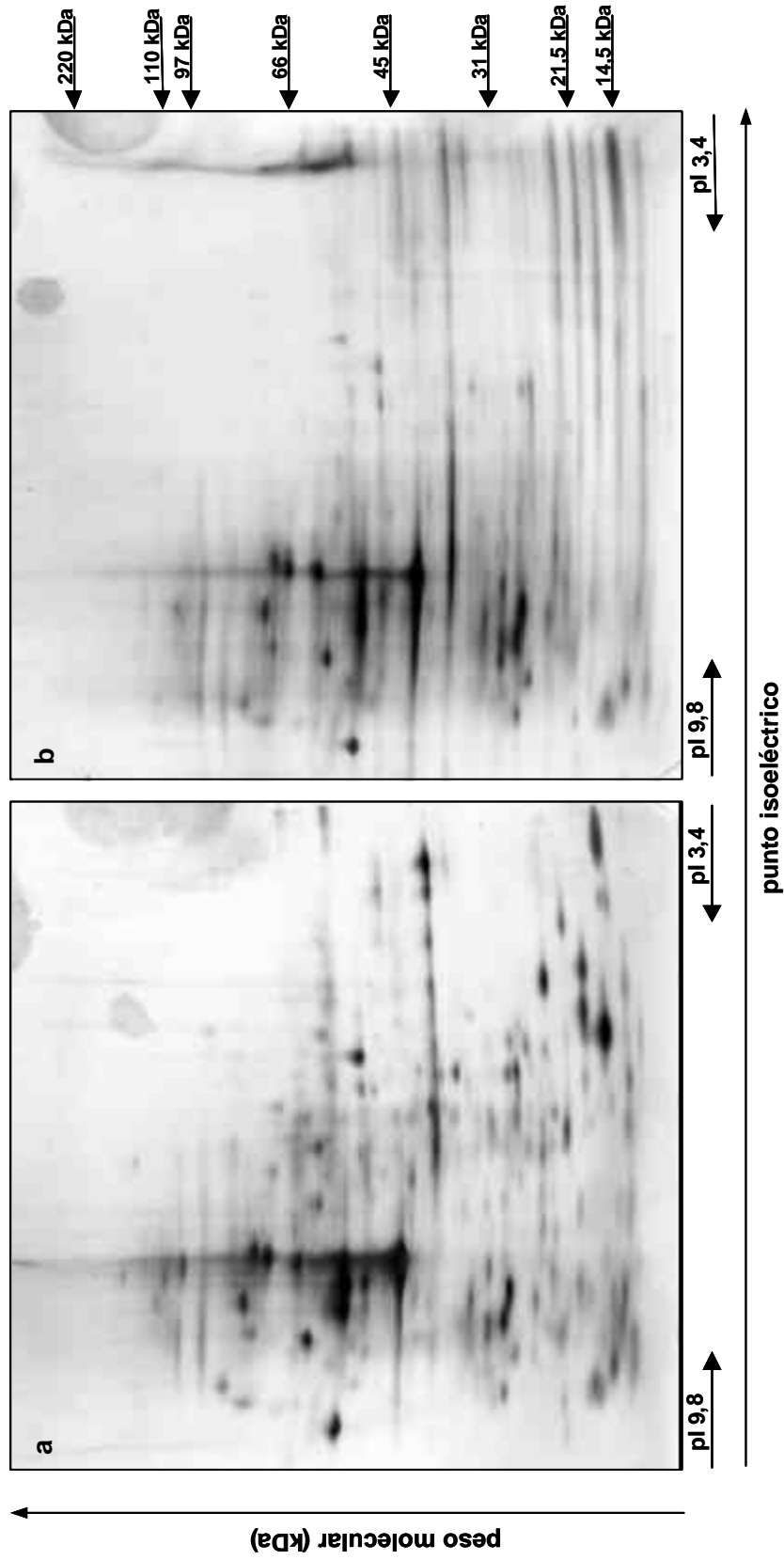


Figura R18. Efecto generalizado de fludarabina en el patrón proteico en una LLC-B representativa (LLC 42A). Cuando se realiza una electroforesis bidimensional de un extracto de células mononucleares de LLC-B sin tratar (a) y tratadas con fludarabina 50 μ M durante 24 horas (b) se observa que existen varios puntos de diferente peso molecular y punto isoeléctrico (pI) cuya expresión varía con el tratamiento.

RESULTADOS

Cuando se hace un estudio comparativo entre las cinco muestras a las que se le ha realizado electroforesis bidimensional sobre extractos sin tratar y tratados con fludarabina, se observan una serie de puntos cuya expresión varía en más de una de las muestras estudiadas (Figura R19.). Puesto que dos de las muestras pertenecen a distintas extracciones del mismo paciente LLC-B se parte de éstas para analizar los puntos cuya expresión varía en ambas con el tratamiento con fludarabina. De todas las proteínas comunes resultantes, se analiza cuales además varían en su expresión en alguna de las otras tres muestras estudiadas. En la tabla R14. se da el valor aproximado del punto isoeléctrico y del peso molecular de las proteínas cuya expresión se ha observado que varía con el tratamiento en las cinco muestras estudiadas (Tabla R14. rojo), de las que varían en cuatro de las cinco muestras (Tabla R14. naranja) y las que varían en tres de las cinco muestras (Tabla R14. verde).

Tabla R14. Punto isoeléctrico y peso molecular aproximado de las proteínas 2 D.

Id proteínas	nº muestras en que varía la expresión	punto isoeléctrico (pH)	peso molecular (kDa)
1	4	≅ 4,4	≅ 40,0
2	4	≅ 4,6	≅ 40,0
3	3	≅ 5,6	≅ 31,0
4	4	≅ 5,5	≅ 52,0
5	4	≅ 4,8	≅ 21,5
6	4	≅ 5,8	≅ 60,0
7	3	≅ 6,0	≅ 60,0
8	4	≅ 5,6	≅ 22,0
9	5	≅ 6,1	≅ 20,5
10	3	≅ 5,4	≅ 27,5
11	5	≅ 5,1	≅ 23,0
12	5	≅ 5,8	≅ 21,0
13	3	≅ 5,6	≅ 23,0
14	4	≅ 4,0	≅ 16,0
15	4	≅ 8,0	≅ 75,0
16	4	≅ 7,4	≅ 33,0
17	5	≅ 6,7	≅ 23,5

Como se puede observar el efecto de fludarabina sobre las células de LLC-B es un efecto múltiple sobre el patrón de proteínas de las células mononucleares de LLC-B. Existen 13 proteínas que varían en su expresión en al menos cuatro muestras provenientes de tres pacientes con LLC-B distintos.

Aunque fludarabina parece producir un efecto fundamentalmente disminuyendo la expresión proteica, en algún caso se observa un aumento de la expresión de algunas proteínas tras el tratamiento con la droga (Figura R19.b, 15, 16 y 17).

RESULTADOS

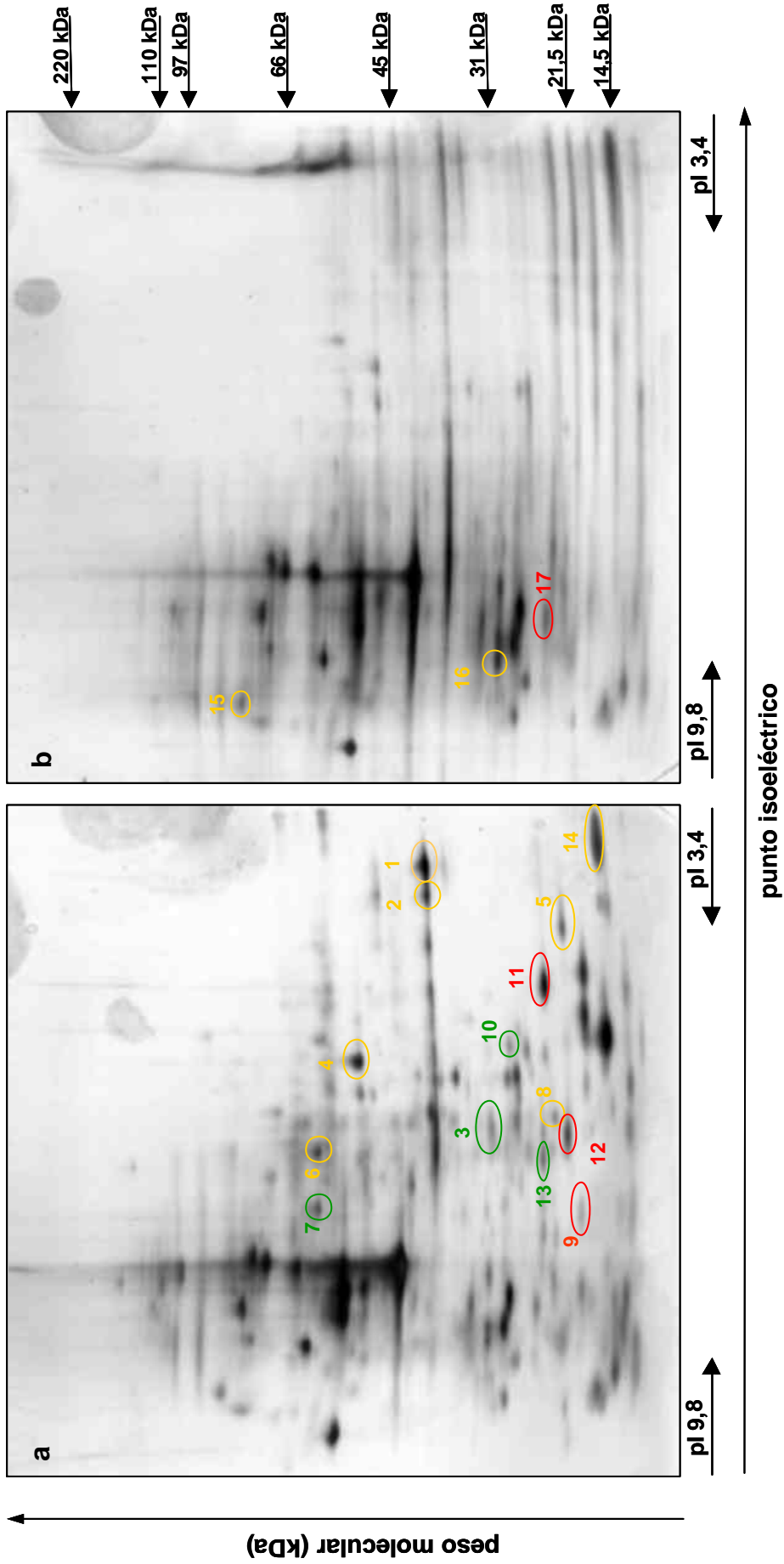


Figura R19. Estudio comparativo del efecto de fludarabina en el patrón proteico en la LLC-B. Electroforesis bidimensional de un extracto de células mononucleares de LLC-B sin tratar (a) y tratadas con fludarabina 50 μ M durante 24 horas (b). Sobre las imágenes de los geles se han marcado las proteínas cuya expresión varía con el tratamiento con la droga. La variación en la expresión de algunas de estas proteínas se han observado en las 5 muestras estudiadas (rojo), otros en 4 de las 5 muestras estudiadas (naranja), y finalmente otros en 3 de las 5 muestras (verde).

RESULTADOS

7. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS CELULAS ADHERENTES EN LA MUERTE CELULAR *IN VITRO* DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE LLC-B

Cuando las células mononucleares de pacientes con LLC-B se mantienen en cultivo durante un tiempo prolongado (10-14 días) sobre el fondo de la placa de cultivo crecen en número variable dependiendo de la leucemia unas células de morfología diversa que se adhieren a la placa de cultivo. Algunos autores han descrito que estas células podrían ejercer un papel de células "nodriza" (NLC: *nurse-like cells*) de las células tumorales de LLC-B protegiéndolas de la entrada en apoptosis *in vitro*. Son diversos los mecanismos de acción que se han descrito mediante los cuales estas células podrían ejercer esta acción protectora, bien mediante una interacción célula-célula, bien mediante la secreción de diversos factores solubles al medio extracelular.

En este trabajo se analiza el fenotipo de estas células adherentes, su papel protector sobre las células tumorales de pacientes con LLC-B, tanto en la apoptosis espontánea como en la apoptosis inducida por fludarabina. Además se analiza el efecto que fludarabina ejerce sobre estas células adherentes.

7.1. Las NLC se detectan en cultivos de células mononucleares de pacientes con LLC y expresan marcadores de estirpe monocítica

Tras 14 días de cultivo, para permitir el crecimiento de las células adherentes, se retiran las células en suspensión para realizar el estudio fenotípico de las células adherentes mediante la técnica de inmunohistoquímica (Figura R20.).

Las células adherentes se tiñen intensamente con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas de superficie CD14, CD45 y HLA-DR. También se tiñen aunque más débilmente con los anticuerpos anti-CD33 y anti-CD34. Cuando se incuban con anticuerpos anti-CD13, anti-CD15, anti-CD19 y anti-CD134, las células adherentes son negativas. Este patrón de tinción, con marcadores propios de células monocito-macrofágicas de sangre periférica, de acuerdo con los datos previamente publicados para las NLC (*Tsukada, et al 2002*), indican que estas células son de estirpe monocítica.

RESULTADOS

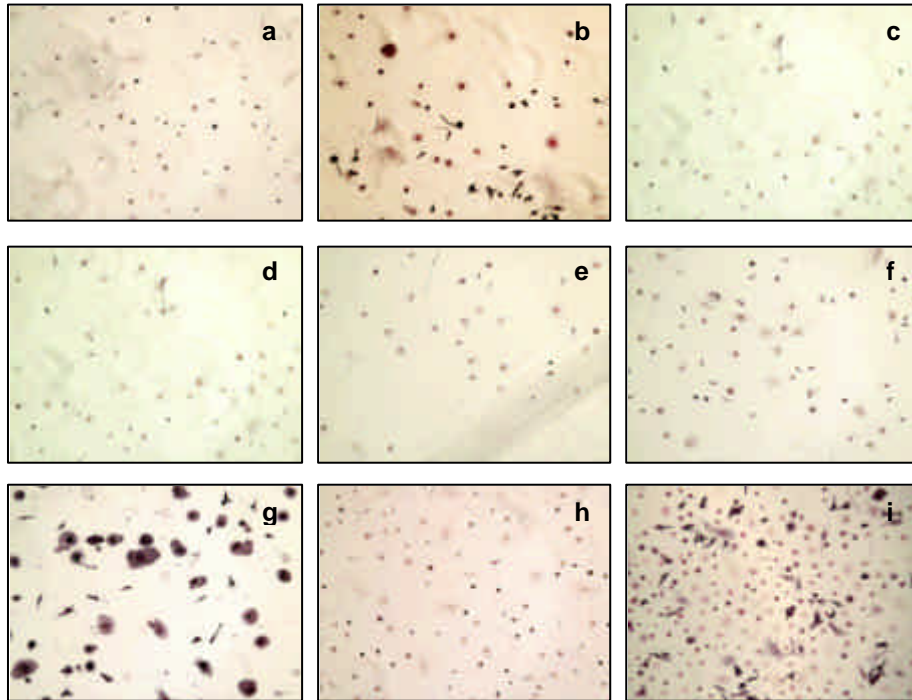


Figura R20. Estudio inmunofenotípico de las NLC. Células mononucleares de una LLC-B representativa (LLC 50A) se incuban durante 14 días tras los cuales las células en suspensión se retiran para realizar el análisis de las NLC mediante inmunohistoquímica incubándolas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas de superficie; **a:** CD13; **b:** CD14; **c:** CD15; **d:** CD19; **e:** CD33; **f:** CD34; **g:** CD45; **h:** CD123; y **i:** HLA-DR. Tras la incubación con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa, se lleva a cabo la reacción de color resultando de un color rojo las células positivas. Las NLC de la LLC 50A se tiñen fuertemente para anti-CD14 (**b**), anti-CD45 (**g**) y anti-HLA-DR (**i**), y más débilmente para anti-CD33 (**e**) y anti-CD34 (**f**). Las fotografías digitales de las NLC están hechas a un aumento de 40x.

7.2. Las NLC protegen a las células LLC-B CD19+/CD5+ de la apoptosis espontánea *in vitro*

Para analizar el papel protector que las células adherentes pueden ejercer sobre las células tumorales de LLC, se realiza una primera aproximación experimental tal y como se describe en la sección 9.2. de MATERIAL Y METODOS.

Para ello se cultivan las células en suspensión de tres LLC-B (Figura R21.: LLC 48A, LLC 49A y LLC 50A) en presencia o ausencia de las NLC. En los tres casos, en las células CD19+/CD5+ cultivadas en ausencia de las NLC, la apoptosis aumenta progresivamente a lo largo del tiempo. La muerte de las células CD19+/CD5+ puede ser debida en parte a la manipulación de las mismas durante el

RESULTADOS

experimento. Por lo tanto, la comparación de los porcentajes de apoptosis se realiza entre las células tumorales separadas, lavadas y cultivadas de nuevo con las NLC (Figura R21.: A2), y la apoptosis de las células tumorales separadas, lavadas y cultivadas en ausencia de las NLC (Figura R21.: A3). En las tres pacientes, la apoptosis de las células CD19+/CD5+ cultivadas sin NLC fue significativamente mayor que sus respectivos controles de manipulación a las 48, 72 y 96 horas. Estos datos muestran, de acuerdo con los previamente publicados, que las NLC protegen a las células CD19+/CD5+ de la apoptosis espontánea *in vitro*.

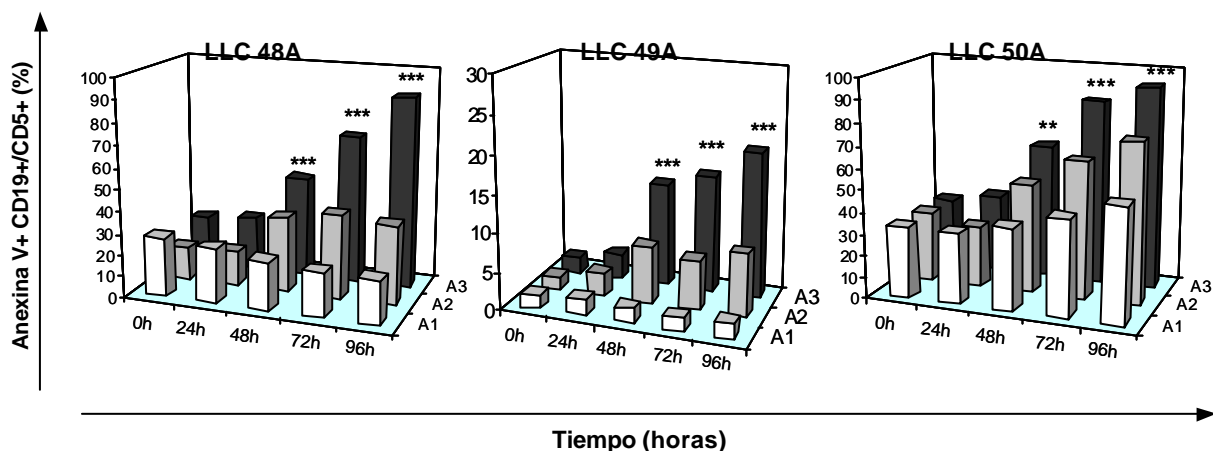


Figura R21. Las NLC protegen a las células LLC-B de la apoptosis espontánea. Células en suspensión se cultivan en presencia o ausencia de NLC. Células mononucleares de tres pacientes con LLC-B (LLC 48A, LLC49A, LLC 50A) se mantienen en cultivo en tres placas durante 14 días para permitir el crecimiento de las NLC.

Control de apoptosis espontánea (A1). Células en suspensión y NLC separadas, lavadas en PBS y cultivadas de nuevo juntas (A2). Células en suspensión y NLC separadas, lavadas en PBS y después las células en suspensión se cultivan en ausencia de las NLC (A3). La apoptosis de las células CD19+/CD5+ de cada placa es analizada mediante tinción con anexina V a las 0 horas (inicio del experimento), 24 horas (inmediatamente después del tratamiento cruzado), 48, 72 and 96 horas. ** Aumento significativo en el porcentaje de apoptosis de A3 comparado con A2 con un valor de $p < 0,01$. *** Aumento significativo en el porcentaje de apoptosis de A3 comparado con A2 con un valor de $p < 0,001$.

7.3. Fludarabina elimina los precursores de las NLC en cultivos de células mononucleares de pacientes con LLC-B e induce la apoptosis de las NLC

Cuando las células mononucleares frescas de LLC se cultivan inmediatamente en presencia de fludarabina, no aparecen NLC tras varias semanas de cultivo. Los precursores que pueden generar las NLC son eliminados tras el tratamiento con fludarabina. Cuando se dejan crecer las NLC en cultivo y se tratan con fludarabina

RESULTADOS

50 μ M durante 24 horas, el número de NLC que quedan en el cultivo tras diez días, es significativamente menor que cuando las NLC no se tratan con la droga (Tabla R15.). En todos los casos, la viabilidad de las células NLC no tratadas fue mayor del 80% y menor del 20% en el caso de las células NLC tratadas con fludarabina.

Tabla R15. Contaje de las NLC después de 10 días de tratamiento con fludarabina.

ID pacientes	Número de NLC				p
	NLC sin tratar		NLC fludarabina 50 μ M		
	media \pm desviación estándar		media \pm desviación estándar		
LLC 48A	153,33	\pm 21,20	46,00	\pm 11,27	0,0042
LLC 49A	189,67	\pm 49,32	24,67	\pm 5,50	0,0272
LLC 50A	163,33	\pm 14,47	39,33	\pm 2,51	0,0036

En la Figura R22. se muestra una imagen representativa de NLC no tratadas y tratadas con fludarabina en la que las NLC muertas se muestran teñidas con azul tripán.

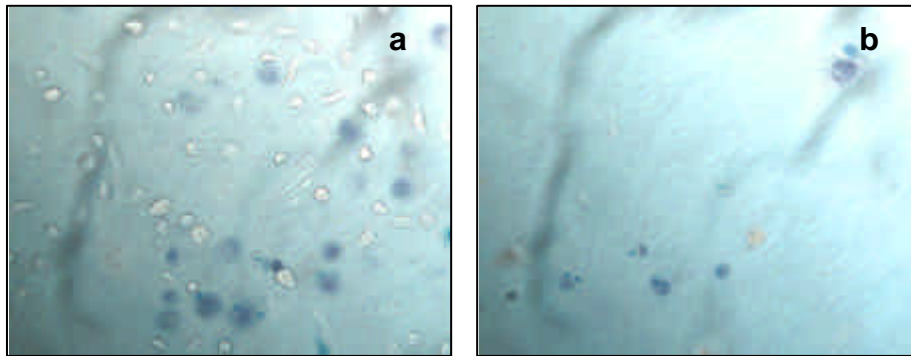


Figura R22. Fludarabina induce la muerte celular de las NLC. El experimento muestra las NLC de una LLC-B representativa (LLC 48A): NLC diferenciadas sin tratar (**a**); NLC diferenciadas tratadas con fludarabina 50 μ M durante 24 horas (**b**). Las NLC se examinan mediante exclusión con azul tripán después de 10 días del tratamiento. El número total de NLC tratadas con fludarabina es significativamente menor que el de las NLC no tratadas tiñéndose prácticamente todas con azul tripán. Las fotografías digitales de las NLC están hechas a un aumento de 40x.

RESULTADOS

7.4. Las NLC no protegen a las células LLC-B CD19+/CD5+ de la apoptosis inducida por fludarabina

Para analizar el papel que pueden desempeñar las NLC en la apoptosis inducida por fludarabina en las células tumorales, se realizan cultivos cruzados incubando las células tumorales tratadas y sin tratar con fludarabina con las NLC tratadas y sin tratar con la droga (Figura R23.). Cuando las células CD19+/CD5+ se tratan con fludarabina, el porcentaje de apoptosis de estas células, es progresivamente mayor a lo largo del experimento. La apoptosis en las células tumorales es similar independientemente de que se cultiven con NLC tratadas o no con fludarabina llegando a similares porcentajes de muerte celular tras 96 horas de tratamiento.

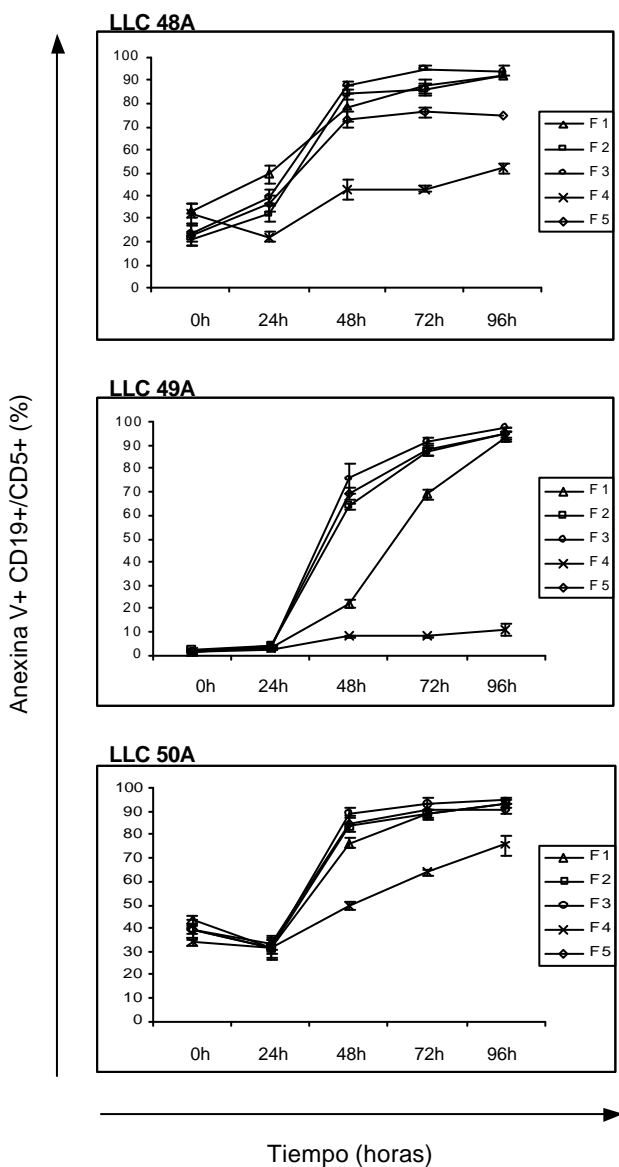


Figura R23. Las NLC no protegen a las células CD19+/CD5+ de la apoptosis inducida por fludarabina. Se realizan cultivos cruzados con las células mononucleares de tres LLC-B (LLC 48A, LLC 49A y LLC 50A) para analizar el papel de las NLC en la apoptosis inducida por fludarabina en las células CD19+/CD5+. Se tomo una alícuota de cada placa de cultivo: **F1**: control de la apoptosis inducida por fludarabina (células en suspensión y NLC tratadas con fludarabina); **F2**: células en suspensión y NLC tratadas con fludarabina; **F3**: células en suspensión tratadas con fludarabina cultivadas sin NLC; **F4**: células en suspensión no tratadas y NLC tratadas con fludarabina ; **F5**: células en suspensión tratadas con fludarabina y NLC no tratadas. El análisis de la apoptosis de las células CD19+/CD5+ se realiza a las 0 horas (inmediatamente antes del tratamiento con fludarabina), a las 24 horas (inmediatamente después del tratamiento cruzado), 48, 72 y 96 horas. Cuando las células en suspensión son tratadas con fludarabina, los porcentajes de células CD19+/CD5+ anexina V+ son progresivamente mayores y son similares independientemente de que sean cultivadas con NLC tratadas con fludarabina (F2), sin NLC (F3) o con NLC no tratadas (F5).

RESULTADOS

También se observan similares resultados en otras tres LLC-B (LLC51, LLC52 y LLC53). En estas LLC-B no se realizan los controles A3 y F3 y el estudio de apoptosis mediante citometría de flujo se realizó a las 0, 24, 48 y 72 horas. La tabla R17. muestra la media \pm desviación estándar de los porcentajes de apoptosis de las LLC-B: LLC 51A y LLC 52A, LLC 53A.

Se puede comprobar que siempre que las células leucémicas has sido tratadas con fludarabina (Tabla R16.: F1, F2 y F5), la apoptosis de las mismas aumenta progresivamente independientemente de que estén cultivadas con NLC tratadas o sin tratar, y la apoptosis es mayor que la de las células LLC-B no tratadas (Tabla R16.: A1, A2 y F4).

Tabla R16. Apoptosis de las células leucémicas de tres pacientes LLC-B durante los tratamientos cruzados.

Tiempo	placa A1		placa A2		placa F1		placa F2		placa F4		placa F5	
	media	\pm DE ^a	media	\pm DE ^a	media	\pm DE ^a	media	\pm DE ^a	media	\pm DE ^a	media	\pm DE ^a
0 horas	29,44	\pm 33,04	29,76	\pm 21,20	29,15	\pm 25,95	32,18	\pm 23,17	31,85	\pm 22,30	32,31	\pm 22,84
24 horas	25,84	\pm 27,38	27,95	\pm 17,91	28,45	\pm 17,89	35,88	\pm 19,48	30,88	\pm 18,09	29,29	\pm 16,37
48 horas	27,15	\pm 15,49	36,09	\pm 12,95	78,80	\pm 16,40	85,17	\pm 12,01	34,34	\pm 13,54	79,16	\pm 18,76
72 horas	26,55	\pm 21,57	41,96	\pm 17,05	94,85	\pm 1,77	96,42	\pm 1,13	36,23	\pm 15,01	94,36	\pm 4,64

^a Media \pm desviación estándar de tres pacientes LLC-B (LLC-B: LLC 51A y LLC 52A, LLC 53A) expresada en porcentajes.

DISCUSSION

DISCUSION

DISCUSION

Los resultados del presente estudio demuestran claramente que todas las drogas empleadas en el mismo inducen la muerte *in vitro* de las células tumorales CD19+/CD5+ de los pacientes con LLC-B. Este no es un hallazgo nuevo en el caso de la fludarabina cuya actividad citotóxica en la LLC-B es conocida desde hace más de 15 años (*Keating, et al 1989*). Sin embargo, en el caso de los inhibidores de JAK kinasas, cuya citotoxicidad se ha puesto de manifiesto en otros tipos de leucemias, es la primera vez que se demuestra su capacidad para inducir *in vitro* la apoptosis de las células tumorales de LLC-B. La apoptosis inducida por las drogas empleadas en este estudio es dependiente del tiempo de actuación de la droga en el cultivo y de la dosis de la droga empleada en el mismo. Además, la entrada en apoptosis induce unos cambios morfológicos en la célula que se correlacionan con el marcaje de las células apoptóticas con anexina V.

Como ya se ha dicho en la introducción, los mecanismos de acción por los cuales un análogo de purinas como la fludarabina induce la muerte de las células tumorales de leucemias con una baja tasa de proliferación no están del todo aclarados. La acción de esta droga sobre los mecanismos que intervienen en la síntesis del ADN (*Plunkett, et al 1990*), sirve para explicar la capacidad citotóxica de esta droga en las leucemias cuyas células se encuentran en división por lo que deben existir otros mecanismos de acción que expliquen la citotoxicidad de fludarabina en las leucemias cuyas células se encuentra en estado quiescente como es el caso de la LLC-B.

Entre estos mecanismos, el efecto de fludarabina sobre la vía JAK/STAT y concretamente la inhibición específica de STAT1 por parte de esta droga (*Frank, et al 1999*), supuso una nueva visión de la actuación de los análogos de purinas como fludarabina sobre las células tumorales de la LLC-B y por *ende* sobre leucemias con una baja tasa de proliferación. Este posible mecanismo de acción atrajo el interés de nuestro laboratorio con tradición en el estudio de la vía JAK/STAT (*Gimeno, et al 1996, Illa, et al 1997, Plaza, et al 2004*). Además, esta posible actuación de fludarabina y la implicación de STAT1 en la supervivencia de la células de LLC-B, estaba de acuerdo con datos previamente publicados donde se mostraban que ciertas citocinas tienen *in vitro* un efecto protector sobre las células de LLC-B frente a la apoptosis (*Dancescu, et al 1992, Francia di Celle, et al 1996*). Entre estas citocinas con capacidad antiapoptótica se

DISCUSION

encuentra IFN- γ (Buschle, *et al* 1993), en cuya señalización como ya se ha comentado, es clave la participación de STAT1.

En el trabajo de Frank y colaboradores, se observaba que el tratamiento *in vitro* con fludarabina inducía de manera específica una inhibición de STAT1 en las células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos tanto en estado quiescente como tras ser activados. En este estudio además se analiza la actuación de fludarabina sobre STAT1 *ex vivo* en las células mononucleares de un paciente con LLC-B 24 horas después de haber recibido una infusión de la droga. En este paciente se observaba una inhibición muy pronunciada de STAT1 en comparación con las células mononucleares del paciente previamente al tratamiento con fludarabina. A la vista de estos datos, decidimos realizar un estudio con un número más amplio de pacientes con LLC-B para comprobar si efectivamente la acción de fludarabina sobre STAT1 podría ser uno de los mecanismos de acción de esta droga induciendo la apoptosis de las células tumorales de la LLC-B.

Puesto que fludarabina, como ya se ha comentado anteriormente, tiene diversos efectos sobre las células en las que actúa, podría ocurrir que uno de estos efectos de la droga fuese la afectación de otras proteínas de modo similar a como lo hace con STAT1, y que fuese la acción sobre alguna o varias de estas proteínas y no su acción directa sobre STAT1 la causa responsable de la inducción de la apoptosis en la LLC-B. Por lo tanto, y para comprobar hasta que punto la inhibición de STAT1 es realmente el factor determinante de la inducción de la apoptosis en esta leucemia, se introdujeron en el estudio otras drogas que tuvieran una estructura totalmente distinta de la de fludarabina, un análogo de purinas, y que a su vez fuesen capaces de actuar sobre la vía de señalización JAK/STAT. Un tipo de drogas que cumplen estos requisitos son los inhibidores de JAK kinasas, AG490 y WHI-P131 descritas en la bibliografía como drogas capaces de inhibir específicamente JAK2 y JAK3 respectivamente (Gazit, *et al* 1991).

Cuando analizamos la actuación de fludarabina sobre STAT1 se observaba que a pesar de que fludarabina a las dosis empleadas en este estudio era capaz de inducir la apoptosis en un alto porcentaje de células tumorales en todas las muestras de LLC-B analizadas, no era capaz de inhibir significativamente la activación de STAT1 por IFN- γ . En el grupo de 9 muestras de LLC-B tratadas con fludarabina durante 45 minutos, el porcentaje global de inhibición de la activación de STAT1 con la dosis más alta empleada fue sólo de un 3,31%, siendo de un 22,65% en el conjunto de las 15 muestras de LLC-B tratadas con la droga a esa misma dosis durante 24 horas. En este

DISCUSION

último grupo solamente se observó una inhibición significativa respecto a su control de activación en tres de las muestras tratadas con fludarabina durante 24 horas.

Estos resultados obtenidos en nuestro estudio aparentemente discordantes con los publicados por *Frank* y colaboradores en su primer estudio, han sido ratificados posteriormente por un trabajo reciente de este mismo grupo (*Friedberg, et al 2004*) que aparece publicado cuando nuestro trabajo se había completado. En este segundo trabajo, en un grupo de 14 muestras provenientes de otros tantos pacientes con LLC-B tras ser tratadas *in vitro* durante 24 horas con la misma dosis de fludarabina que la empleada en el presente estudio (50 μ M), sólo se observa una inhibición global de STAT1 del 37% en las células de LLC-B tratadas con fludarabina respecto a las células no tratadas. En cuanto a la disminución de STAT1 analizada de manera individual para cada una de las muestras, en el segundo trabajo del grupo de *Frank*, en una de las muestras analizadas la inhibición de STAT1 es de un 75% aproximadamente mientras que en otras tres muestras se observa una disminución de STAT1 de aproximadamente el 50%. En el resto de las muestras analizadas en el trabajo del grupo de *Frank*, la inhibición de STAT1 observada ronda entre el 25% y el 15%. Estos datos concuerdan con los que se muestran en el presente trabajo, en los que tras el tratamiento con fludarabina con la misma dosis y durante el mismo periodo de tiempo se observa, como se ha mencionado antes, una inhibición global de STAT1 del 22,65%, de modo que se observa una importante disminución de STAT1 en dos de las muestras de LLC-B, una disminución en torno al 40% en otras dos muestras, observándose una disminución de STAT1 en el resto de las muestras similar a la del trabajo mencionado. Por lo tanto, los datos obtenidos por *Frank* y colaboradores coinciden más con los presentados en este trabajo que con los inicialmente obtenidos por dicho grupo en su primera publicación, dejando claro que la inhibición de STAT1 por parte de fludarabina no parece ser uno de los mecanismos de acción de esta droga en la inducción de la apoptosis de las células tumorales de LLC-B.

El hecho de que fludarabina no actúe a través de la inhibición de la señalización por STAT1 para ejercer su efecto citotóxico, no excluye la importancia de la señalización de la vía JAK/STAT en la biología de la LLC-B. La importancia de esta vía en el mantenimiento de la viabilidad de las células de LLC-B queda patente cuando se analizan los datos obtenidos del tratamiento con los inhibidores de JAK kinasas, AG490 y WHI-P131. AG490 es una molécula de la familia de las tirfostinas que se describe inicialmente como un inhibidor selectivo de la tirosina kinasa JAK2 (*Levitzi*

DISCUSION

1999) y por lo tanto es capaz de interferir con la activación de STAT1 tras el estímulo de IFN- γ . El otro inhibidor de JAK kinasas empleado en el presente trabajo es WHI-P131 que ha sido descrito como un inhibidor específico de la tirosina kinasa JAK3 (Sudbeck, *et al* 1999). Cuando se analizan los resultados de las muestras de LLC-B tratadas con AG490 y con WHI-P131, se observa que ambas drogas producen una clara inhibición de la activación de STAT1 con las dos dosis empleadas. Cuando se analiza la inhibición de STAT1 tras el tratamiento con AG490 ya se observa cierta inhibición en el conjunto de las muestras de LLC-B tratadas con AG490 durante 45 minutos que se hace muy evidente en el conjunto de muestras tratadas con la droga durante 24 horas. En este caso, la inhibición global que se observa en el conjunto de muestras de LLC-B tratadas con AG490 es del 41,17% y del 70,18% para las dosis más baja y para la más alta respectivamente, observándose una inhibición significativa de STAT1 en 10 de las 11 muestras tratadas con la dosis más alta empleada.

En cuanto al tratamiento de las muestras de LLC-B con WHI-P131, los datos del presente estudio muestran claramente que esta droga es capaz de bloquear la activación de STAT1 por IFN- γ en las células de LLC-B indicando que esta droga también afecta a la vía de señalización de STAT1 que implica la actuación de las tirosina kinasas JAK1 y JAK2 en las células de LLC-B. Al igual que con el tratamiento con AG490, se observa una cierta inhibición en el conjunto de las muestras de LLC-B tratadas con WHI-P131 durante 45 minutos que se hace muy evidente en el conjunto de muestras tratadas con la droga durante 24 horas. En este último conjunto de muestras de LLC-B, se observa una inhibición global de la activación de STAT1 del 63,75% y del 78,73% con la dosis más baja y con la dosis más alta de la droga respectivamente. Resulta interesante que cuando las células de LLC-B son tratadas con WHI-P131 a la dosis más alta empleada durante 24 horas, se observa una correlación significativa entre la supresión de la activación de STAT1 y la apoptosis inducida por esta droga en las células de LLC-B.

Tal y como muestran los resultados de este estudio, AG490 inhibe la activación de STAT1 induciendo además la apoptosis de las células de LLC-B. Sin embargo, puesto que se ha demostrado que AG490 también es capaz de inhibir la tirosina kinasa JAK3 (Amin, *et al* 2003, Wang, *et al* 1999), no se puede excluir una posible implicación de otras vías en la apoptosis de las células de LLC-B inducida por AG490. En el caso de WHI-P131, descrito como un inhibidor específico de JAK3, en este trabajo, se describe por primera vez la acción de esta droga sobre otras JAK kinasas. En efecto, la activación

DISCUSION

de STAT1 por parte de IFN- γ es dependiente de las tirosina kinasas JAK1 y JAK2 tal y como ya se ha descrito previamente (*Igarashi, et al 1994*), de modo que nuestros datos apoyarían que en las células de LLC-B analizadas, WHI-P131 es capaz de inhibir JAK1, JAK2 o ambas.

Como ya se ha comentado anteriormente, se ha descrito que diversas citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-4 o IL-8 son capaces de inhibir la apoptosis *in vitro* en un importante porcentaje de células LLC-B. Por otra parte, las células LLC-B producen IL-7 y expresan el receptor de IL-7 lo que podría jugar un papel importante en el proceso leucémico (*Frishman, et al 1993*). Por lo tanto, las drogas como AG490 y WHI-P131, capaces de suprimir la señalización a través de las JAK kinasas, podrían bloquear las señales antiapoptóticas provenientes de estas u otras citocinas explicando así la clara inducción por parte de estas drogas de la apoptosis de las células de LLC-B. Puesto que la apoptosis inducida por fludarabina no parece relacionada con la inhibición de la vía de STAT1, la combinación de esta droga con los inhibidores de JAK kinasas podría tener un efecto sinérgico en la inducción de la apoptosis de las células de LLC-B ofreciendo así una potencial estrategia terapéutica en los pacientes con LLC-B.

A la vista de los datos presentados en este trabajo, la vía JAK/STAT, concretamente la inhibición de la misma, puede jugar un papel importante en la inducción de la muerte de las células de LLC-B pero no parece que éste sea uno de los mecanismos de acción de la fludarabina para ejercer su citotoxicidad por lo que deben ser otros los efectos que esta droga ejerce sobre las células de LLC-B. Por lo tanto, el siguiente paso que se planteó en este estudio fue el de analizar otras posibles acciones de fludarabina y su efecto sobre la viabilidad de las células de LLC-B.

Teniendo en cuenta los datos previamente publicados que indican la acción inhibitoria de fludarabina sobre la síntesis de ARN y las posibles consecuencias que este efecto puede tener sobre la síntesis de proteínas y en último término sobre la viabilidad celular (*Huang, et al 2000b*), se planteó un análisis más amplio con el objeto de estudiar las variaciones que se podrían observar en la síntesis de proteínas tras el tratamiento con fludarabina de las células de LLC-B.

En el presente trabajo se muestra por primera vez el análisis comparativo de los extractos celulares de células mononucleares de sangre periférica sin tratar y tratadas con fludarabina de pacientes con LLC-B llevado a cabo mediante electroforesis bidimensional. Se analiza la diferencia en el patrón de proteínas de cinco muestras pertenecientes a cuatro pacientes con LLC-B tratadas *in vitro* con una dosis de 50 μ M

DISCUSION

durante 24 horas donde se observa que el efecto de la droga sobre las proteínas celulares no es un efecto específico afectando exclusivamente a una proteína sino que se trata más bien de un efecto más general. En el análisis del patrón de proteínas mediante electroforesis bidimensional de las muestras de LLC-B, al menos 17 proteínas distintas se encuentran afectadas en su expresión en las muestras tratadas respecto a sus controles que no han recibido tratamiento. Para evitar que el análisis se viera influenciado por posibles variaciones individuales entre las distintas muestras, en el estudio realizado en el presente trabajo se han analizado dos muestras distintas del mismo paciente además de otras tres muestras de otros tantos pacientes con LLC-B de modo que sólo se ha tenido en cuenta aquellas proteínas cuya expresión variaba en al menos tres de las muestras incluidas en el estudio. De esta manera, 13 de las proteínas estaban afectadas en al menos cuatro de las muestras analizadas y de éstas, cuatro estaban afectadas en las cinco muestras analizadas.

Es importante destacar que el tratamiento con fludarabina lleva a una depleción preferente de ciertas proteínas en las células de LLC-B ya observado en electroforesis de una sola dimensión en trabajos previos (*Huang, et al 2000b*). Este fenómeno se puede explicar por el hecho de que fludarabina probablemente afecte de manera preferente al ARN y a las proteínas de vida media corta. Por eso aunque la disminución de la cantidad total de proteínas tras el tratamiento con fludarabina durante 24 horas no sea muy importante, entre las proteínas afectadas se pueden encontrar algunas que sean críticas para la supervivencia de las células de LLC-B. De acuerdo con esto, se ha sugerido que la inhibición de la síntesis de IL-2 y su receptor por parte de fludarabina puede ser uno de los mecanismos de acción en la apoptosis inducida por esta droga en los linfocitos T (*Bartik and Kay 1998*). Por lo tanto, si la depleción en la síntesis de diversas proteínas requeridas en la supervivencia de las células de LLC-B es un mecanismo para matar las células leucémicas, esta inhibición proteica puede ser un mecanismo a tener en cuenta en posibles estrategias terapéuticas. De hecho, el empleo de sustancias que inhiben la síntesis proteica o la combinación de éstas con drogas que afecten además a la síntesis de ARN podrían ser posibles tratamientos a evaluar en la LLC-B (*Collins, et al 1991, Huang, et al 2000b*).

Otro punto importante que hasta el momento no se ha abordado a la hora de analizar el efecto de las drogas y concretamente de la fludarabina sobre una leucemia como la LLC-B, en la que la interacción de las células tumorales con el microambiente es muy importante en el mantenimiento de su viabilidad, es el efecto que esta droga

DISCUSION

puede tener sobre dicho ambiente y cómo puede influir en la viabilidad de la LLC-B. Como ya se ha visto anteriormente la acumulación de la células tumorales en la LLC-B es debida a un defecto en la muerte celular programada más que a una excesiva proliferación celular (*Caligaris-Cappio and Hamblin 1999, Kitada, et al 1998*). Aunque los procesos moleculares responsables del desarrollo final de la LLC-B no se conocen, existen datos actuales que apoyan la hipótesis de que las células B transformadas CD5+ no son autónomas en su capacidad para evadir las señales apoptóticas. En el cultivo *in vitro* de células de LLC-B purificadas se observa una rápida regulación negativa de las señales antiapoptóticas y por ello una rápida entrada en apoptosis de estas células (*McConkey, et al 1996*). Estos datos sugieren que en condiciones *ex vivo* faltan señales esenciales para la supervivencia recibidas por las células de LLC-B *in vivo* (*Caligaris-Cappio and Hamblin 1999, Jurlander 1998*). Entre los efectos antiapoptóticos mediados por otras células que pueden jugar un papel como *nurselike cells* (NLC) se ha implicado la liberación de factores solubles así como interacciones célula-célula (*Burger, et al 2000, Moreno, et al 2001*).

Las aproximaciones experimentales diseñadas para analizar la acción de la fludarabina en la LLC-B, se han centrado en el papel que la droga tiene directamente en las células tumorales de la LLC-B sin prestar una especial atención en su posible efecto sobre otras células como las NLC que pueden jugar un papel muy importante en la supervivencia de las células de LLC-B (*Ghia and Caligaris-Cappio 2000*). Por lo tanto, la realización de estudios para analizar los efectos de fludarabina sobre las NLC resultan importantes para saber si la apoptosis inducida por esta droga en las células de LLC-B es una consecuencia de la acción directa de la droga sobre las células tumorales o bien una consecuencia de la falta de factores antiapoptóticos como consecuencia de la acción de la droga sobre las NLC.

De acuerdo con lo datos previamente publicados, cuando se realizan cultivos de células mononucleares de sangre periférica de larga duración, se observa la aparición de una población celular de diversa morfología que crecen adheridas a la placa de cultivo. Estas células adherentes expresan marcadores de superficie propios de la estirpe monocítica y además son capaces de proteger de la apoptosis espontánea a las células tumorales de LLC-B jugando un papel de NLC (*Tsukada, et al 2002*). Tras comprobar mediante inmunohistoquímica que el fenotipo de estas células adherentes es compatible con el previamente descrito y que efectivamente protegen a las células tumorales de LLC-B de la muerte espontánea por apoptosis, se realiza una aproximación experimental consistente en la realización de cultivos cruzados entre

DISCUSION

células tumorales sin tratar y tratadas con fludarabina y NLC sin tratar y tratadas con la droga para ver si las NLC son capaces de contrarrestar el efecto que fludarabina tiene sobre la viabilidad de las células tumorales.

Los datos del presente estudio muestran que fludarabina es capaz de bloquear el desarrollo de las NLC en el cultivo de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LLC-B. Por otra parte, cuando se permite el crecimiento de estas NLC, el tratamiento con fludarabina durante 24 horas es capaz de producir la muerte celular de las NLC diferenciadas. Cuando se realizan los cultivos cruzados, los resultados muestran que a pesar de que fludarabina es capaz de inducir la muerte celular de las NLC y las células CD19+/CD5+ de la LLC-B, la apoptosis inducida por fludarabina en éstas últimas es debido a un efecto directo sobre las mismas y no debido al efecto de la droga sobre las NLC. Las células CD19+/CD5+ de la LLC-B tratadas con fludarabina entran en apoptosis en una proporción similar independientemente de que hayan sido cultivadas con NLC sin tratar o tratadas con fludarabina.

A pesar de que el presente estudio indica que fludarabina es capaz de inducir las apoptosis en las células LLC-B *in vitro* debido principalmente a su acción directa sobre estas células, estos datos no excluyen la posibilidad de que fludarabina pudiera afectar a otros tipos celulares (células estromales, células macrofágicas, etc) que pueden tener un importante papel en la supervivencia de las células LLC-B *in vivo*.

Por último, aunque los mecanismos de acción de fludarabina en la inducción de la apoptosis en la LLC-B no están del todo esclarecidos, esta fuera de toda duda que esta droga es un potente inductor de la muerte celular en distintos tipos celulares. Este hecho, hace de fludarabina una herramienta idónea para el estudio general de los mecanismos de inducción de apoptosis, no sólo en cáncer, si no también en otros procesos como puede ser el caso de la selección en el timo de los linfocitos T o en patologías de base autoinmune como el lupus en el que los defectos en los mecanismos de apoptosis intervienen en la patogénesis de la enfermedad (*Pickering, et al 2000, Viillard, et al 1999*).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los efectos *in vitro* de fludarabina y los inhibidores de JAK kinasas, AG490 y WHI-P131 tanto en la viabilidad celular como en la activación de STAT1 por IFN- γ son dosis y tiempo dependientes.
2. El marcaje con anexina V de las células apoptóticas de LLC-B se correlaciona con los cambios morfológicos que estas células sufren durante el proceso apoptótico.
3. Fludarabina y los inhibidores de JAK kinasas son capaces de inducir *in vitro* la muerte celular por apoptosis en la mayoría de las células CD19+/CD5+ de pacientes con LLC-B tras 72 horas de tratamiento *in vitro* con las respectivas drogas.
4. Fludarabina no es capaz de inhibir la activación de STAT1 por IFN- γ en los extractos celulares de la mayoría de las muestras de LLC-B tras el tratamiento *in vitro* con esta droga.
5. AG490 y WHI-P131 son capaces de inhibir la activación de STAT1 por IFN- γ tras el tratamiento *in vitro* durante 24 horas en la mayoría de las muestras de LLC-B.
6. El efecto *in vitro* de fludarabina en el patrón proteico de las células de LLC-B es un efecto múltiple en el que son varias las proteínas celulares que se afectan tras el tratamiento con la droga durante 24 horas.
7. Las células NLC protegen de la muerte celular *in vitro* a las células tumorales de LLC-B en cultivos prolongados de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LLC-B.
8. Fludarabina es capaz de bloquear *in vitro* el desarrollo de las células NLC en cultivos prolongados y es capaz de inducir la muerte celular de las NLC ya desarrolladas en los cultivos de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LLC-B.

CONCLUSIONES

9. La muerte celular por la apoptosis inducida por fludarabina de las células CD19+/CD5+ de LLC-B es un efecto directo e independiente del efecto de las células NLC sobre estas células tumorales.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Akira, S. **2000**. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene*, 19, 2607-2611.
- Alas, S. & Bonavida, B. **2003**. Inhibition of Constitutive STAT3 Activity Sensitizes Resistant Non-Hodgkin's Lymphoma and Multiple Myeloma to Chemotherapeutic Drug-mediated Apoptosis. *Clin Cancer Res*, 9, 316-326.
- Alexander, W.S., Starr, R., Fenner, J.E., Scott, C.L., Handman, E., Sprigg, N.S., Corbin, J.E., Cornish, A.L., Darwiche, R., Owczarek, C.M., Kay, T.W., Nicola, N.A., Hertzog, P.J., Metcalf, D. & Hilton, D.J. **1999**. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell*, 98, 597-608.
- Alonzi, T., Maritano, D., Gorgoni, B., Rizzuto, G., Libert, C. & Poli, V. **2001**. Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol Cell Biol*, 21, 1621-1632.
- Amin, H.M., Medeiros, L.J., Ma, Y., Feretzaki, M., Das, P., Leventaki, V., Rassidakis, G.Z., O'Connor, S.L., McDonnell, T.J. & Lai, R. **2003**. Inhibition of JAK3 induces apoptosis and decreases anaplastic lymphoma kinase activity in anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene*, 22, 5399-5407.
- Aoki, N. & Matsuda, T. **2000**. A cytosolic protein-tyrosine phosphatase PTP1B specifically dephosphorylates and deactivates prolactin-activated STAT5a and STAT5b. *J Biol Chem*, 275, 39718-39726.
- Aoki, Y., Feldman, G.M. & Tosato, G. **2003**. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood*, 101, 1535-1542.
- Aravind, L. & Koonin, E.V. **2000**. SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci*, 25, 112-114.
- Arnould, C., Philippe, C., Bourdon, V., Gr goire, M.J., Berger, R. & Jonveaux, P. **1999**. The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet*, 8, 1741-1749.
- Aronica, M.G., Brizzi, M.F., Dentelli, P., Rosso, A., Yarden, Y. & Pegoraro, L. **1996**. p91 STAT1 activation in interleukin-3-stimulated primary acute myeloid leukemia cells. *Oncogene*, 13, 1017-1026.
- Azam, M., Lee, C., Strehlow, I. & Schindler, C. **1997**. Functionally distinct isoforms of STAT5 are generated by protein processing. *Immunity*, 6, 691-701.
- Bach, E.A., Tanner, J.W., Marsters, S., Ashkenazi, A., Aguet, M., Shaw, A.S. & Schreiber, R.D. **1996**. Ligand-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in intact cells. *Mol Cell Biol*, 16, 3214-3221.

REFERENCIAS

- Barboule, N., Baldin, V., S, J.O., Vidal, S. & Valette, A. **1998**. Increased level of p21 in human ovarian tumors is associated with increased expression of cdk2, cyclin A and PCNA. *Int J Cancer*, 76, 891-896.
- Barillas-Mury, C., Han, Y.S., Seeley, D. & Kafatos, F.C. **1999**. Anopheles gambiae Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *Embo J*, 18, 959-967.
- Bartik, M.M. & Kay, N.E. **1998**. Inhibition of IL-2 production mediates fludarabine-induced suppression of normal human T cell activation leading to apoptosis. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 39, 469.
- Baselga, J. **2000**. New therapeutic agents targeting the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*, 18, 54S-59S.
- Battle, T.E. & Frank, D.A. **2003**. STAT1 mediates differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells in response to Bryostat 1. *Blood*, 102, 3016-3024.
- Battle, T.E., Wierda, W.G., Rassenti, L.Z., Zahrieh, D., Neuberg, D., Kipps, T.J. & Frank, D.A. **2003**. In vivo activation of signal transducer and activator of transcription 1 after CD154 gene therapy for chronic lymphocytic leukemia is associated with clinical and immunologic response. *Clin Cancer Res*, 9, 2166-2172.
- Beadling, C., Ng, J., Babbage, J.W. & Cantrell, D.A. **1996**. Interleukin-2 activation of STAT5 requires the convergent action of tyrosine kinases and a serine/threonine kinase pathway distinct from the Raf1/ERK2 MAP kinase pathway. *Embo J*, 15, 1902-1913.
- Begleiter, A., Glazer, R.I., Israels, L.G., Pugh, L. & Johnston, J.B. **1987**. Induction of DNA strand breaks in chronic lymphocytic leukemia following treatment with 2'-deoxycoformycin in vivo and in vitro. *Cancer Res*, 47, 2498-2503.
- Behr, S.I., Korinth, D. & Schriever, F. **1998**. Differential adhesion pattern of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 12, 71-77.
- Ben-Bassat, H., Rosenbaum-Mitrani, S., Hartzstark, Z., Shlomai, Z., Kleinberger-Doron, N., Gazit, A., Plowman, G., Levitzki, R., Tsvieli, R. & Levitzki, A. **1997**. Inhibitors of epidermal growth factor receptor kinase and of cyclin-dependent kinase 2 activation induce growth arrest, differentiation, and apoptosis of human papilloma virus 16-immortalized human keratinocytes. *Cancer Res*, 57, 3741-3750.
- Benekli, M., Baer, M.R., Baumann, H. & Wetzler, M. **2003**. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*, 101, 2940-2954.
- Bhattacharya, S. & Schindler, C. **2003**. Regulation of Stat3 nuclear export. *J Clin Invest*, 111, 553-559.
- Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M.T., Monconduit, M., Belabbès, S. & Gremy, F. **1981**. A new prognostic

REFERENCIAS

- classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48, 198-206.
- Bluyssen, H.A. & Levy, D.E. **1997**. Stat2 is a transcriptional activator that requires sequence-specific contacts provided by stat1 and p48 for stable interaction with DNA. *J Biol Chem*, 272, 4600-4605.
- Bowman, T., Broome, M.A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W.J., Sedivy, J.M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S.A. & Jove, R. **2001**. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 7319-7324.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. & Jove, R. **2000**. STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19, 2474-2488.
- Brager, P. & Grever, M. **1986**. 9-b-D-Arabinofuranosyl-2-fluoroadenine reduces NAD in normal lymphocytes a neoplastic cells in CLL. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 27, 21.
- Bromberg, J. **2002**. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*, 109, 1139-1142.
- Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W. & Darnell, J.E., Jr. **1998**. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol*, 18, 2553-2558.
- Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Wen, Z., Schreiber, R.D. & Darnell, J.E., Jr. **1996**. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 7673-7678.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C. & Darnell, J.E., Jr. **1999**. Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98, 295-303.
- Buettner, R., Mora, L.B. & Jove, R. **2002**. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*, 8, 945-954.
- Burdelya, L., Catlett-Falcone, R., Levitzki, A., Cheng, F., Mora, L.B., Sotomayor, E., Coppola, D., Sun, J., Sebt, S., Dalton, W.S., Jove, R. & Yu, H. **2002**. Combination therapy with AG-490 and interleukin 12 achieves greater antitumor effects than either agent alone. *Mol Cancer Ther*, 1, 893-899.
- Burger, J.A. & Kipps, T.J. **2002**. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk Lymphoma*, 43, 461-466.
- Burger, J.A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N.J., Dell'Aquila, M. & Kipps, T.J. **2000**. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 96, 2655-2663.
- Buschle, M., Campana, D., Carding, S.R., Richard, C., Hoffbrand, A.V. & Brenner, M.K. **1993**. Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, 177, 213-218.

REFERENCIAS

- Caldenhoven, E., van Dijk, T.B., Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L. & de Groot, R.P. **1996**. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem*, 271, 13221-13227.
- Caligaris-Cappio, F. & Hamblin, T.J. **1999**. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol*, 17, 399-408.
- Calo, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N. & Russo, A. **2003**. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol*, 197, 157-168.
- Candotti, F., Oakes, S.A., Johnston, J.A., Giliani, S., Schumacher, R.F., Mella, P., Fiorini, M., Ugazio, A.G., Badolato, R., Notarangelo, L.D., Bozzi, F., Macchi, P., Strina, D., Vezzoni, P., Blaese, R.M., O'Shea, J.J. & Villa, A. **1997**. Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood*, 90, 3996-4003.
- Carlesso, N., Frank, D.A. & Griffin, J.D. **1996**. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med*, 183, 811-820.
- Carron, C., Cormier, F., Janin, A., Lacronique, V., Giovannini, M., Daniel, M.T., Bernard, O. & Ghysdael, J. **2000**. TEL-JAK2 transgenic mice develop T-cell leukemia. *Blood*, 95, 3891-3899.
- Carson, D.A., Wasson, D.B. & Beutler, E. **1984**. Antileukemic and immunosuppressive activity of 2-chloro-2'-deoxyadenosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 2232-2236.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S. & Jove, R. **1999**. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 10, 105-115.
- Cetkovic-Cvrlje, M., Dragt, A.L., Vassilev, A., Liu, X.P. & Uckun, F.M. **2003**. Targeting JAK3 with JANEX-1 for prevention of autoimmune type 1 diabetes in NOD mice. *Clin Immunol*, 106, 213-225.
- Chapman, R.S., Lourenco, P.C., Tonner, E., Flint, D.J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A.R. & Watson, C.J. **1999**. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev*, 13, 2604-2616.
- Chatterjee-Kishore, M., Wright, K.L., Ting, J.P. & Stark, G.R. **2000**. How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J*, 19, 4111-4122.
- Chaturvedi, P., Reddy, M.V. & Reddy, E.P. **1998**. Src kinases and not JAKs activate STATs during IL-3 induced myeloid cell proliferation. *Oncogene*, 16, 1749-1758.

REFERENCIAS

- Chen, C.Y., Tsay, W., Tang, J.L., Shen, H.L., Lin, S.W., Huang, S.Y., Yao, M., Chen, Y.C., Shen, M.C., Wang, C.H. & Tien, H.F. **2003a**. SOCS1 methylation in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 37, 300-305.
- Chen, M., Cheng, A., Chen, Y.Q., Hymel, A., Hanson, E.P., Kimmel, L., Minami, Y., Taniguchi, T., Changelian, P.S. & O'Shea, J.J. **1997**. The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 6910-6915.
- Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J.E., Jr. & Kuriyan, J. **1998**. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*, 93, 827-839.
- Chen, Y., Wen, R., Yang, S., Schuman, J., Zhang, E.E., Yi, T., Feng, G.S. & Wang, D. **2003b**. Identification of Shp-2 as a Stat5A phosphatase. *J Biol Chem*, 278, 16520-16527.
- Cheson, B.D., Bennett, J.M., Grever, M., Kay, N., Keating, M.J., O'Brien, S. & Rai, K.R. **1996**. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, 87, 4990-4997.
- Chiorazzi, N. & Ferrarini, M. **2003**. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol*, 21, 841-894.
- Chitnis, T., Najafian, N., Benou, C., Salama, A.D., Grusby, M.J., Sayegh, M.H. & Khoury, S.J. **2001**. Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*, 108, 739-747.
- Cho, S.S., Bacon, C.M., Sudarshan, C., Rees, R.C., Finbloom, D., Pine, R. & O'Shea, J.J. **1996**. Activation of STAT4 by IL-12 and IFN-alpha: evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation. *J Immunol*, 157, 4781-4789.
- Chu, P., Deforce, D., Pedersen, I.M., Kim, Y., Kitada, S., Reed, J.C. & Kipps, T.J. **2002**. Latent sensitivity to Fas-mediated apoptosis after CD40 ligation may explain activity of CD154 gene therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3854-3859.
- Chung, J., Uchida, E., Grammer, T.C. & Blenis, J. **1997**. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 17, 6508-6516.
- CLL Trialists' Collaborative Group. **1999**. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst*, 91, 861-868.
- Cohnen, S.J., Sanden, D., Cacalano, N.A., Yoshimura, A., Mui, A., Migone, T.S. & Johnston, J.A. **1999**. SOCS-3 is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation. *Mol Cell Biol*, 19, 4980-4988.
- Collins, R.J., Harmon, B.V., Souvlis, T., Pope, J.H. & Kerr, J.F. **1991**. Effects of cycloheximide on B-chronic lymphocytic leukaemic and normal lymphocytes in vitro: induction of apoptosis. *Br J Cancer*, 64, 518-522.

REFERENCIAS

- Collins, R.J., Verschuer, L.A., Harmon, B.V., Prentice, R.L., Pope, J.H. & Kerr, J.F. **1989**. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol*, 71, 343-350.
- Crocker, B.A., Krebs, D.L., Zhang, J.G., Wormald, S., Willson, T.A., Stanley, E.G., Robb, L., Greenhalgh, C.J., Forster, I., Clausen, B.E., Nicola, N.A., Metcalf, D., Hilton, D.J., Roberts, A.W. & Alexander, W.S. **2003**. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol*, 4, 540-545.
- Dalton, W.S. & Jove, R. **1999**. Drug resistance in multiple myeloma: approaches to circumvention. *Semin Oncol*, 26, 23-27.
- Dancescu, M., Rubio-Trujillo, M., Biron, G., Bron, D., Delespesse, G. & Sarfati, M. **1992**. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med*, 176, 1319-1326.
- Dang, C.V., Resar, L.M., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J.E., Wonsey, D. & Zeller, K. **1999**. Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res*, 253, 63-77.
- Danial, N.N., Losman, J.A., Lu, T., Yip, N., Krishnan, K., Krolewski, J., Goff, S.P., Wang, J.Y. & Rothman, P.B. **1998**. Direct interaction of Jak1 and v-Abl is required for v-Abl-induced activation of STATs and proliferation. *Mol Cell Biol*, 18, 6795-6804.
- Danial, N.N., Pernis, A. & Rothman, P.B. **1995**. Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene. *Science*, 269, 1875-1877.
- Darnell, J.E., Jr. **1997**. STATs and gene regulation. *Science*, 277, 1630-1635.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. & Stark, G.R. **1994**. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264, 1415-1421.
- Davey, H.W., McLachlan, M.J., Wilkins, R.J., Hilton, D.J. & Adams, T.E. **1999**. STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver. *Mol Cell Endocrinol*, 158, 111-116.
- David, M., Chen, H.E., Goelz, S., Larner, A.C. & Neel, B.G. **1995a**. Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol*, 15, 7050-7058.
- David, M., Petricoin, E., 3rd, Benjamin, C., Pine, R., Weber, M.J. & Larner, A.C. **1995b**. Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science*, 269, 1721-1723.
- de Groot, R.P., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Jove, R. & Koenderman, L. **1999**. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood*, 94, 1108-1112.
- de Groot, R.P., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W. & Koenderman, L. **2000**. STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol Cell Biol Res Commun*, 3, 299-305.

REFERENCIAS

- de la Fuente, M.T., Casanova, B., Garcia-Gila, M., Silva, A. & Garcia-Pardo, A. **1999**. Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia*, 13, 266-274.
- de la Fuente, M.T., Casanova, B., Moyano, J.V., Garcia-Gila, M., Sanz, L., Garcia-Marco, J., Silva, A. & Garcia-Pardo, A. **2002**. Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J Leukoc Biol*, 71, 495-502.
- De Rossi, G., Zarcone, D., Mauro, F., Cerruti, G., Tenca, C., Puccetti, A., Mandelli, F. & Grossi, C.E. **1993**. Adhesion molecule expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: malignant cell phenotypes define distinct disease subsets. *Blood*, 81, 2679-2687.
- de Toter, D., Montera, M., Rosso, O., Clavio, M., Balleari, E., Foa, R. & Gobbi, M. **2004**. Resistance to CD95-mediated apoptosis of CD40-activated chronic lymphocytic leukemia B cells is not related to lack of DISC molecules expression. *Hematol J*, 5, 152-160.
- Decker, T., Flohr, T., Trautmann, P., Aman, M.J., Holter, W., Majdic, O., Huber, C. & Peschel, C. **1995**. Role of accessory cells in cytokine production by T cells in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood*, 86, 1115-1123.
- DiSanto, J.P., Muller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A. & Rajewsky, K. **1995**. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 377-381.
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M. & Lichter, P. **2000**. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343, 1910-1916.
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Dohner, K., Bentz, M. & Lichter, P. **1999**. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med*, 77, 266-281.
- Druker, B.J., Sawyers, C.L., Kantarjian, H., Resta, D.J., Reese, S.F., Ford, J.M., Capdeville, R. & Talpaz, M. **2001**. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*, 344, 1038-1042.
- Dupuis, S., Dargemont, C., Fieschi, C., Thomassin, N., Rosenzweig, S., Harris, J., Holland, S.M., Schreiber, R.D. & Casanova, J.L. **2001**. Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science*, 293, 300-303.
- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I.Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chappier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., Al Ghoniaim, A., Tufenkeji, H., Frayha, H., Al-Gazlan, S., Al-Rayes, H., Schreiber, R.D., Gresser, I. & Casanova, J.L. **2003**. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet*, 33, 388-391.

REFERENCIAS

- Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C. & Levy, D.E. **1996**. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*, 84, 443-450.
- Einhorn, S., Burvall, K., Juliusson, G., Gahrton, G. & Meeker, T. **1989**. Molecular analyses of chromosome 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 3, 871-874.
- Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S. & Yoshimura, A. **1997**. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387, 921-924.
- Epling-Burnette, P.K., Liu, J.H., Catlett-Falcone, R., Turkson, J., Oshiro, M., Kothapalli, R., Li, Y., Wang, J.M., Yang-Yen, H.F., Karras, J., Jove, R. & Loughran, T.P., Jr. **2001**. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest*, 107, 351-362.
- Feng, J., Witthuhn, B.A., Matsuda, T., Kohlhuber, F., Kerr, I.M. & Ihle, J.N. **1997**. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol*, 17, 2497-2501.
- Ferrajoli, A. & O'Brien, S.M. **2004**. Treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*, 31, 60-65.
- Fluckiger, A.C., Durand, I. & Banchereau, J. **1994**. Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *J Exp Med*, 179, 91-99.
- Francia di Celle, P., Mariani, S., Riera, L., Stacchini, A., Reato, G. & Foa, R. **1996**. Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood*, 87, 4382-4389.
- Frank, D.A. **1999**. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of cancer. *Mol Med*, 5, 432-456.
- Frank, D.A., Mahajan, S. & Ritz, J. **1997**. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest*, 100, 3140-3148.
- Frank, D.A., Mahajan, S. & Ritz, J. **1999**. Fludarabine-induced immunosuppression is associated with inhibition of STAT1 signaling. *Nat Med*, 5, 444-447.
- Friedberg, J.W., Dong, D.A., Li, S., Kim, H., Stephans, K., Noonan, K., Neubergh, D., Gribben, J.G., Fisher, D.C., Freedman, A.S., Takvorian, T., Jurgens, R., Battle, T.E. & Frank, D.A. **2004**. Oral fludarabine has significant activity in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia, and leads to increased STAT1 levels in vivo. *Leuk Res*, 28, 139-147.
- Frishman, J., Long, B., Knospe, W., Gregory, S. & Plate, J. **1993**. Genes for interleukin 7 are transcribed in leukemic cell subsets of individuals with chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, 177, 955-964.

REFERENCIAS

- Fry, D.W., Kraker, A.J., McMichael, A., Ambroso, L.A., Nelson, J.M., Leopold, W.R., Connors, R.W. & Bridges, A.J. **1994**. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science*, 265, 1093-1095.
- Fujitani, Y., Hibi, M., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, H., Yamaguchi, T., Sugiyama, K., Yamanaka, Y., Nakajima, K. & Hirano, T. **1997**. An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene*, 14, 751-761.
- Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J.Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E.W., Magrath, I.T., Knowles, D.M. & Dalla-Favera, R. **1991**. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5413-5417.
- Galm, O., Yoshikawa, H., Esteller, M., Osieka, R. & Herman, J.G. **2003**. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood*, 101, 2784-2788.
- Gandhi, V. & Plunkett, W. **2002**. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine. *Clin Pharmacokinet*, 41, 93-103.
- Garcia, R., Bowman, T.L., Niu, G., Yu, H., Minton, S., Muro-Cacho, C.A., Cox, C.E., Falcone, R., Fairclough, R., Parsons, S., Laudano, A., Gazit, A., Levitzki, A., Kraker, A. & Jove, R. **2001**. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*, 20, 2499-2513.
- Garcia, R., Yu, C.L., Hudnall, A., Catlett, R., Nelson, K.L., Smithgall, T., Fujita, D.J., Ethier, S.P. & Jove, R. **1997**. Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ*, 8, 1267-1276.
- Gauzzi, M.C., Velazquez, L., McKendry, R., Mogensen, K.E., Fellous, M. & Pellegrini, S. **1996**. Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J Biol Chem*, 271, 20494-20500.
- Gazit, A., Oshero, N., Posner, I., Yaish, P., Poradosu, E., Gilon, C. & Levitzki, A. **1991**. Tyrphostins. 2. Heterocyclic and alpha-substituted benzylidenemalononitrile tyrphostins as potent inhibitors of EGF receptor and ErbB2/neu tyrosine kinases. *J Med Chem*, 34, 1896-1907.
- Ghia, P. & Caligaris-Cappio, F. **2000**. The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res*, 79, 157-173.
- Gimeno, R., Codony-Servat, J., Plana, M., Rodriguez-Sanchez, J.L. & Juarez, C. **1996**. Stat1 implication in the immune response to superantigens in vivo. *J Immunol*, 156, 1378-1386.
- Gooch, J.L., Christy, B. & Yee, D. **2002**. STAT6 mediates interleukin-4 growth inhibition in human breast cancer cells. *Neoplasia*, 4, 324-331.

REFERENCIAS

- Grandis, J.R., Drenning, S.D., Chakraborty, A., Zhou, M.Y., Zeng, Q., Pitt, A.S. & Tweardy, D.J. **1998**. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth In vitro. *J Clin Invest*, 102, 1385-1392.
- Grandis, J.R., Drenning, S.D., Zeng, Q., Watkins, S.C., Melhem, M.F., Endo, S., Johnson, D.E., Huang, L., He, Y. & Kim, J.D. **2000**. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4227-4232.
- Granziero, L., Ghia, P., Circosta, P., Gottardi, D., Strola, G., Geuna, M., Montagna, L., Piccoli, P., Chilosi, M. & Caligaris-Cappio, F. **2001**. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 97, 2777-2783.
- Greenhalgh, C.J. & Hilton, D.J. **2001**. Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol*, 70, 348-356.
- Greenlund, A.C., Morales, M.O., Viviano, B.L., Yan, H., Krolewski, J. & Schreiber, R.D. **1995**. Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity*, 2, 677-687.
- Gross, M., Liu, B., Tan, J., French, F.S., Carey, M. & Shuai, K. **2001**. Distinct effects of PIAS proteins on androgen-mediated gene activation in prostate cancer cells. *Oncogene*, 20, 3880-3887.
- Guipaud, O., Deriano, L., Salin, H., Vallat, L., Sabatier, L., Merle-Beral, H. & Delic, J. **2003**. B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a polymorphic family unified by genomic features. *Lancet Oncol*, 4, 505-514.
- Gurniak, C.B. & Berg, L.J. **1996**. Murine JAK3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells. *Blood*, 87, 3151-3160.
- Hamblin, T.J. & Oscier, D.G. **1998**. *Chronic lymphocytic leukemia*. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E. & Reed, J.C. **1993**. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 82, 1820-1828.
- Harpur, A.G., Andres, A.C., Ziemiecki, A., Aston, R.R. & Wilks, A.F. **1992**. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene*, 7, 1347-1353.
- Hilkens, C.M., Is'harc, H., Lillemeier, B.F., Strobl, B., Bates, P.A., Behrmann, I. & Kerr, I.M. **2001**. A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. *FEBS Lett*, 505, 87-91.
- Ho, J.M., Beattie, B.K., Squire, J.A., Frank, D.A. & Barber, D.L. **1999**. Fusion of the ets transcription factor TEL to Jak2 results in constitutive Jak-Stat signaling. *Blood*, 93, 4354-4364.
- Horita, M., Andreu, E.J., Benito, A., Arbona, C., Sanz, C., Benet, I., Prosper, F. & Fernandez-Luna, J.L. **2000**. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic

REFERENCIAS

- myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med*, 191, 977-984.
- Horvath, C.M. **2000**. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci*, 25, 496-502.
- Horvath, C.M. & Darnell, J.E. **1997**. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 233-239.
- Hou, J., Schindler, U., Henzel, W.J., Ho, T.C., Bresseur, M. & McKnight, S.L. **1994**. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science*, 265, 1701-1706.
- Hou, J., Schindler, U., Henzel, W.J., Wong, S.C. & McKnight, S.L. **1995**. Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2. *Immunity*, 2, 321-329.
- Huang, M., Dorsey, J.F., Epling-Burnette, P.K., Nimmanapalli, R., Landowski, T.H., Mora, L.B., Niu, G., Sinibaldi, D., Bai, F., Kraker, A., Yu, H., Moscinski, L., Wei, S., Djeu, J., Dalton, W.S., Bhalla, K., Loughran, T.P., Wu, J. & Jove, R. **2002**. Inhibition of Bcr-Abl kinase activity by PD180970 blocks constitutive activation of Stat5 and growth of CML cells. *Oncogene*, 21, 8804-8816.
- Huang, M., Page, C., Reynolds, R.K. & Lin, J. **2000a**. Constitutive activation of stat 3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol*, 79, 67-73.
- Huang, P., Chubb, S. & Plunkett, W. **1990**. Termination of DNA synthesis by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. A mechanism for cytotoxicity. *J Biol Chem*, 265, 16617-16625.
- Huang, P. & Plunkett, W. **1986**. Preferential incorporation of arabinofuranosyl-2-fluoroadenine into poly (A⁺) RNA and its inhibitory effects on transcription and translation. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 27, 21.
- Huang, P. & Plunkett, W. **1991**. Action of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine on RNA metabolism. *Mol Pharmacol*, 39, 449-455.
- Huang, P., Sandoval, A., Van Den Neste, E., Keating, M.J. & Plunkett, W. **2000b**. Inhibition of RNA transcription: a biochemical mechanism of action against chronic lymphocytic leukemia cells by fludarabine. *Leukemia*, 14, 1405-1413.
- Igarashi, K., Garotta, G., Ozmen, L., Ziemiecki, A., Wilks, A.F., Harpur, A.G., Larner, A.C. & Finbloom, D.S. **1994**. Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J Biol Chem*, 269, 14333-14336.
- Ilaria, R.L., Jr. & Van Etten, R.A. **1996**. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem*, 271, 31704-31710.

REFERENCIAS

- Illa, I., Gallardo, E., Gimeno, R., Serrano, C., Ferrer, I. & Juarez, C. **1997**. Signal transducer and activator of transcription 1 in human muscle: implications in inflammatory myopathies. *Am J Pathol*, 151, 81-88.
- Imada, K. & Leonard, W.J. **2000**. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol*, 37, 1-11.
- Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, C.D., Aitken, K., Iscove, N., Koretzky, G., Johnson, P., Liu, P., Rothstein, D.M. & Penninger, J.M. **2001**. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*, 409, 349-354.
- Ivaska, J., Bosca, L. & Parker, P.J. **2003**. PKCepsilon is a permissive link in integrin-dependent IFN-gamma signalling that facilitates JAK phosphorylation of STAT1. *Nat Cell Biol*, 5, 363-369.
- Jaksic, B., Brugiattelli, M., Krc, I., Losonczi, H., Holowiecki, J., Planinc-Peraica, A., Kusec, R., Morabito, F., Iacopino, P. & Lutz, D. **1997**. High dose chlorambucil versus Binet's modified cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone regimen in the treatment of patients with advanced B-cell chronic lymphocytic leukemia. Results of an international multicenter randomized trial. International Society for Chemo-Immunotherapy, Vienna. *Cancer*, 79, 2107-2114.
- Jurlander, J. **1998**. The cellular biology of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 27, 29-52.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J. & Schreiber, R.D. **1998a**. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7556-7561.
- Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T. & Grusby, M.J. **1996**. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, 382, 174-177.
- Kaplan, M.H., Whitfield, J.R., Boros, D.L. & Grusby, M.J. **1998b**. Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response. *J Immunol*, 160, 1850-1856.
- Karaghiosoff, M., Neubauer, H., Lassnig, C., Kovarik, P., Schindler, H., Pircher, H., McCoy, B., Bogdan, C., Decker, T., Brem, G., Pfeffer, K. & Muller, M. **2000**. Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity*, 13, 549-560.
- Karni, R., Jove, R. & Levitzki, A. **1999**. Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene*, 18, 4654-4662.
- Kawamura, M., McVicar, D.W., Johnston, J.A., Blake, T.B., Chen, Y.Q., Lal, B.K., Lloyd, A.R., Kelvin, D.J., Staples, J.E., Ortaldo, J.R. & et al. **1994**. Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 6374-6378.

REFERENCIAS

- Kawata, T., Shevchenko, A., Fukuzawa, M., Jermyn, K.A., Totty, N.F., Zhukovskaya, N.V., Sterling, A.E., Mann, M. & Williams, J.G. **1997**. SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in dictyostelium. *Cell*, 89, 909-916.
- Kay, N.E., Hamblin, T.J., Jelinek, D.F., Dewald, G.W., Byrd, J.C., Farag, S., Lucas, M. & Lin, T. **2002**. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 193-213.
- Keating, M.J., Kantarjian, H., Talpaz, M., Redman, J., Koller, C., Barlogie, B., Velasquez, W., Plunkett, W., Freireich, E.J. & McCredie, K.B. **1989**. Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 74, 19-25.
- Kern, C., Cornuel, J.F., Billard, C., Tang, R., Rouillard, D., Stenou, V., Defrance, T., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Simonin, P.Y., Feldblum, S. & Kolb, J.P. **2004**. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood*, 103, 679-688.
- Khaled, A.R. & Durum, S.K. **2002**. Lymphocide: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 2, 817-830.
- Kim, T.K. & Maniatis, T. **1996**. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, 273, 1717-1719.
- Kinjyo, I., Hanada, T., Inagaki-Ohara, K., Mori, H., Aki, D., Ohishi, M., Yoshida, H., Kubo, M. & Yoshimura, A. **2002**. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity*, 17, 583-591.
- Kirito, K., Nagashima, T., Ozawa, K. & Komatsu, N. **2002**. Constitutive activation of Stat1 and Stat3 in primary erythroleukemia cells. *Int J Hematol*, 75, 51-54.
- Kishimoto, T., Taga, T. & Akira, S. **1994**. Cytokine signal transduction. *Cell*, 76, 253-262.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J. & Schindler, C.W. **2002**. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285, 1-24.
- Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J.M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H.G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C.M., Rai, K., Hines, J. & Reed, J.C. **1998**. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*, 91, 3379-3389.
- Kleinberger-Doron, N., Shelah, N., Capone, R., Gazit, A. & Levitzki, A. **1998**. Inhibition of Cdk2 activation by selected tyrosine kinase inhibitors causes cell cycle arrest at late G1 and S phase. *Exp Cell Res*, 241, 340-351.
- Klejman, A., Schreiner, S.J., Nieborowska-Skorska, M., Slupianek, A., Wilson, M., Smithgall, T.E. & Skorski, T. **2002**. The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *Embo J*, 21, 5766-5774.

REFERENCIAS

- Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G. & Lodish, H.F. **1995**. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*, 80, 729-738.
- Kneitz, C., Goller, M., Tony, H., Simon, A., Stibbe, C., Konig, T., Serfling, E. & Avots, A. **2002**. The CD23b promoter is a target for NF-AT transcription factors in B-CLL cells. *Biochim Biophys Acta*, 1588, 41-47.
- Kohlhuber, F., Rogers, N.C., Watling, D., Feng, J., Guschin, D., Briscoe, J., Witthuhn, B.A., Kotenko, S.V., Pestka, S., Stark, G.R., Ihle, J.N. & Kerr, I.M. **1997**. A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Mol Cell Biol*, 17, 695-706.
- Kolb, J.P., Roman, V., Mentz, F., Zhao, H., Rouillard, D., Dugas, N., Dugas, B. & Sigaux, F. **2001**. Contribution of nitric oxide to the apoptotic process in human B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*, 40, 243-257.
- Kondo, M., Takeshita, T., Ishii, N., Nakamura, M., Watanabe, S., Arai, K. & Sugamura, K. **1993**. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science*, 262, 1874-1877.
- Konnikova, L., Kotecki, M., Kruger, M.M. & Cochran, B.H. **2003**. Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer*, 3, 23.
- Kottaridis, P.D., Gale, R.E., Frew, M.E., Harrison, G., Langabeer, S.E., Belton, A.A., Walker, H., Wheatley, K., Bowen, D.T., Burnett, A.K., Goldstone, A.H. & Linch, D.C. **2001**. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, 98, 1752-1759.
- Koyama, M., Nagai, H., Bando, K., Ito, M., Moriyama, Y. & Emi, M. **1999**. Localization of a target region of allelic loss to a 1-cM interval on chromosome 16p.13.13 in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 90, 951-956.
- Krebs, D.L. & Hilton, D.J. **2001**. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*, 19, 378-387.
- Krolewski, J.J., Lee, R., Eddy, R., Shows, T.B. & Dalla-Favera, R. **1990**. Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene*, 5, 277-282.
- Kuperman, D., Schofield, B., Wills-Karp, M. & Grusby, M.J. **1998**. Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *J Exp Med*, 187, 939-948.
- Lacronique, V., Boureux, A., Monni, R., Dumon, S., Mauchauffe, M., Mayeux, P., Gouilleux, F., Berger, R., Gisselbrecht, S., Ghysdael, J. & Bernard, O.A. **2000**. Transforming properties of chimeric TEL-JAK proteins in Ba/F3 cells. *Blood*, 95, 2076-2083.

REFERENCIAS

- Lacronique, V., Boureux, A., Valle, V.D., Poirel, H., Quang, C.T., Mauchauffe, M., Berthou, C., Lessard, M., Berger, R., Ghysdael, J. & Bernard, O.A. **1997**. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*, 278, 1309-1312.
- Laemmli, U.K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C. & Stryckmans, P. **1998**. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*, 91, 2387-2396.
- Lee, C.K., Smith, E., Gimeno, R., Gertner, R. & Levy, D.E. **2000**. STAT1 affects lymphocyte survival and proliferation partially independent of its role downstream of IFN-gamma. *J Immunol*, 164, 1286-1292.
- Lens, D., Dyer, M.J., Garcia-Marco, J.M., De Schouwer, P.J., Hamoudi, R.A., Jones, D., Farahat, N., Matutes, E. & Catovsky, D. **1997**. p53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. *Br J Haematol*, 99, 848-857.
- Leonard, W.J. & O'Shea, J.J. **1998**. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, 16, 293-322.
- Leong, P.L., Andrews, G.A., Johnson, D.E., Dyer, K.F., Xi, S., Mai, J.C., Robbins, P.D., Gadiparthi, S., Burke, N.A., Watkins, S.F. & Grandis, J.R. **2003**. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4138-4143.
- Levesque, M.C., Misukonis, M.A., O'Loughlin, C.W., Chen, Y., Beasley, B.E., Wilson, D.L., Adams, D.J., Silber, R. & Weinberg, J.B. **2003**. IL-4 and interferon gamma regulate expression of inducible nitric oxide synthase in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 17, 442-450.
- Levis, M., Allebach, J., Tse, K.F., Zheng, R., Baldwin, B.R., Smith, B.D., Jones-Bolin, S., Ruggeri, B., Dionne, C. & Small, D. **2002**. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood*, 99, 3885-3891.
- Levitzki, A. **1999**. Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol Ther*, 82, 231-239.
- Levitzki, A. **2002**. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *Eur J Cancer*, 38 Suppl 5, S11-18.
- Levy, D.E. & Darnell, J.E., Jr. **2002**. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 651-662.
- Li, L., Liu, X., Glassman, A.B., Keating, M.J., Stros, M., Plunkett, W. & Yang, L.Y. **1997a**. Fludarabine triphosphate inhibits nucleotide excision repair of cisplatin-induced DNA adducts in vitro. *Cancer Res*, 57, 1487-1494.

REFERENCIAS

- Li, Q. & Verma, I.M. **2002**. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2, 725-734.
- Li, X., Leung, S., Kerr, I.M. & Stark, G.R. **1997b**. Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. *Mol Cell Biol*, 17, 2048-2056.
- Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E. & O'Shea, J.J. **2001**. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 15137-15142.
- Lim, C.P. & Cao, X. **1999**. Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK. *J Biol Chem*, 274, 31055-31061.
- Lin, B., Podar, K., Gupta, D., Tai, Y.T., Li, S., Weller, E., Hideshima, T., Lentzsch, S., Davies, F., Li, C., Weisberg, E., Schlossman, R.L., Richardson, P.G., Griffin, J.D., Wood, J., Munshi, N.C. & Anderson, K.C. **2002**. The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584 inhibits growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer Res*, 62, 5019-5026.
- Lin, J.X., Migone, T.S., Tsang, M., Friedmann, M., Weatherbee, J.A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E.T., Mietz, J., John, S. & et al. **1995**. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity*, 2, 331-339.
- Lin, T.S., Mahajan, S. & Frank, D.A. **2000**. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene*, 19, 2496-2504.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D. & Shuai, K. **1998**. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10626-10631.
- Liu, X., Quinn, A.M., Chin, Y.E. & Fu, X.Y. **1999**. STAT gene found in *C. elegans*. *Science*, 285, 167a.
- Liu, X., Robinson, G.W., Gouilleux, F., Groner, B. & Hennighausen, L. **1995**. Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8831-8835.
- Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A. & Hennighausen, L. **1997**. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev*, 11, 179-186.
- Look, D.C., Pelletier, M.R., Tidwell, R.M., Roswit, W.T. & Holtzman, M.J. **1995**. Stat1 depends on transcriptional synergy with Sp1. *J Biol Chem*, 270, 30264-30267.
- Lord, J.D., McIntosh, B.C., Greenberg, P.D. & Nelson, B.H. **2000**. The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. *J Immunol*, 164, 2533-2541.

REFERENCIAS

- Luo, H., Hanratty, W.P. & Dearolf, C.R. **1995**. An amino acid substitution in the Drosophila hopTum-I Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *Embo J*, 14, 1412-1420.
- Mabuchi, H., Fujii, H., Calin, G., Alder, H., Negrini, M., Rassenti, L., Kipps, T.J., Bullrich, F. & Croce, C.M. **2001**. Cloning and characterization of CLLD6, CLLD7, and CLLD8, novel candidate genes for leukemogenesis at chromosome 13q14, a region commonly deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*, 61, 2870-2877.
- Macchi, P., Villa, A., Giliani, S., Sacco, M.G., Frattini, A., Porta, F., Ugazio, A.G., Johnston, J.A., Candotti, F., O'Shea, J.J. & et al. **1995**. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature*, 377, 65-68.
- Mainou-Fowler, T. & Prentice, A.G. **1996**. Modulation of apoptosis with cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*, 21, 369-377.
- Malakhova, O.A., Yan, M., Malakhov, M.P., Yuan, Y., Ritchie, K.J., Kim, K.I., Peterson, L.F., Shuai, K. & Zhang, D.E. **2003**. Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. *Genes Dev*, 17, 455-460.
- Malaviya, R., Zhu, D., Dibirdik, I. & Uckun, F.M. **1999**. Targeting Janus kinase 3 in mast cells prevents immediate hypersensitivity reactions and anaphylaxis. *J Biol Chem*, 274, 27028-27038.
- Marine, J.C., Topham, D.J., McKay, C., Wang, D., Parganas, E., Stravopodis, D., Yoshimura, A. & Ihle, J.N. **1999**. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell*, 98, 609-616.
- Marley, S.B., Davidson, R.J., Goldman, J.M. & Gordon, M.Y. **2002**. Effects of combinations of therapeutic agents on the proliferation of progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 116, 162-165.
- Masuda, M., Suzui, M., Yasumatu, R., Nakashima, T., Kuratomi, Y., Azuma, K., Tomita, K., Komiyama, S. & Weinstein, I.B. **2002**. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 62, 3351-3355.
- Mavromatis, B. & Cheson, B.D. **2003**. Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 21, 1874-1881.
- McBride, K.M., Banninger, G., McDonald, C. & Reich, N.C. **2002**. Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *Embo J*, 21, 1754-1763.
- McBride, K.M., McDonald, C. & Reich, N.C. **2000**. Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *Embo J*, 19, 6196-6206.
- McConkey, D.J., Chandra, J., Wright, S., Plunkett, W., McDonnell, T.J., Reed, J.C. & Keating, M. **1996**. Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous

REFERENCIAS

- endonuclease content and relative expression of BCL-2 and BAX. *J Immunol*, 156, 2624-2630.
- Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R.N., Clark, R., Aguet, M. & Schreiber, R.D. **1996**. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 84, 431-442.
- Metcalf, D., Greenhalgh, C.J., Viney, E., Willson, T.A., Starr, R., Nicola, N.A., Hilton, D.J. & Alexander, W.S. **2000**. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature*, 405, 1069-1073.
- Meydan, N., Grunberger, T., Dadi, H., Shahar, M., Arpaia, E., Lapidot, Z., Leeder, J.S., Freedman, M., Cohen, A., Gazit, A., Levitzki, A. & Roifman, C.M. **1996**. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature*, 379, 645-648.
- Minami, M., Inoue, M., Wei, S., Takeda, K., Matsumoto, M., Kishimoto, T. & Akira, S. **1996**. STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3963-3966.
- Miyamoto, N., Sugita, K., Goi, K., Inukai, T., Lijima, K., Tezuka, T., Kojika, S., Nakamura, M., Kagami, K. & Nakazawa, S. **2001**. The JAK2 inhibitor AG490 predominantly abrogates the growth of human B-precursor leukemic cells with 11q23 translocation or Philadelphia chromosome. *Leukemia*, 15, 1758-1768.
- Montserrat, E. **2002**. Current and developing chemotherapy for CLL. *Med Oncol*, 19 Suppl, S11-19.
- Mora, L.B., Buettner, R., Seigne, J., Diaz, J., Ahmad, N., Garcia, R., Bowman, T., Falcone, R., Fairclough, R., Cantor, A., Muro-Cacho, C., Livingston, S., Karras, J., Pow-Sang, J. & Jove, R. **2002**. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 62, 6659-6666.
- Moreno, A., Villar, M.L., Camara, C., Luque, R., Cespon, C., Gonzalez-Porque, P., Roy, G., Lopez-Jimenez, J., Bootello, A. & Santiago, E.R. **2001**. Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 97, 242-249.
- Moriggl, R., Topham, D.J., Teglund, S., Sexl, V., McKay, C., Wang, D., Hoffmeyer, A., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Bunting, K.D., Grosveld, G.C. & Ihle, J.N. **1999**. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity*, 10, 249-259.
- Morita, Y., Naka, T., Kawazoe, Y., Fujimoto, M., Narazaki, M., Nakagawa, R., Fukuyama, H., Nagata, S. & Kishimoto, T. **2000**. Signals transducers and activators of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor-1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1)

REFERENCIAS

- suppresses tumor necrosis factor alpha-induced cell death in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5405-5410.
- Mowen, K.A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B.T., Shuai, K., Herschman, H.R. & David, M. **2001**. Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell*, 104, 731-741.
- Mui, A.L., Wakao, H., O'Farrell, A.M., Harada, N. & Miyajima, A. **1995**. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *Embo J*, 14, 1166-1175.
- Munzert, G., Kirchner, D., Stobbe, H., Bergmann, L., Schmid, R.M., Dohner, H. & Heimpel, H. **2002**. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood*, 100, 3749-3756.
- Murakami, Y., Nakano, S., Niho, Y., Hamasaki, N. & Izuhara, K. **1998**. Constitutive activation of Jak-2 and Tyk-2 in a v-Src-transformed human gallbladder adenocarcinoma cell line. *J Cell Physiol*, 175, 220-228.
- Myers, M.P., Andersen, J.N., Cheng, A., Tremblay, M.L., Horvath, C.M., Parisien, J.P., Salmeen, A., Barford, D. & Tonks, N.K. **2001**. TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*, 276, 47771-47774.
- Nabhan, C., Gartenhaus, R.B. & Tallman, M.S. **2004**. Purine nucleoside analogues and combination therapies in B-cell chronic lymphocytic leukemia: dawn of a new era. *Leuk Res*, 28, 429-442.
- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S. & Kishimoto, T. **1997**. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387, 924-929.
- Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K. & Taga, T. **1999**. Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science*, 284, 479-482.
- Narla, R.K., Liu, X.P., Klis, D. & Uckun, F.M. **1998**. Inhibition of human glioblastoma cell adhesion and invasion by 4-(4'-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline (WHI-P131) and 4-(3'-bromo-4'-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline (WHI-P154). *Clin Cancer Res*, 4, 2463-2471.
- Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U. & Pfeffer, K. **1998**. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*, 93, 397-409.
- Ni, Z., Lou, W., Leman, E.S. & Gao, A.C. **2000**. Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 60, 1225-1228.

REFERENCIAS

- Nicholson, S.E., De Souza, D., Fabri, L.J., Corbin, J., Willson, T.A., Zhang, J.G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A.D., Metcalf, D., Hilton, D.J., Nicola, N.A. & Baca, M. **2000**. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6493-6498.
- Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Kossev, P., Wasik, M.A. & Skorski, T. **2002**. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Blood*, 99, 4531-4539.
- Nielsen, M., Kaltoft, K., Nordahl, M., Ropke, C., Geisler, C., Mustelin, T., Dobson, P., Svejgaard, A. & Odum, N. **1997**. Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides: tyrphostin AG490 inhibits Stat3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 6764-6769.
- Ning, Z.Q., Li, J. & Arceci, R.J. **2001**. Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood*, 97, 3559-3567.
- Niu, G., Bowman, T., Huang, M., Shivers, S., Reintgen, D., Daud, A., Chang, A., Kraker, A., Jove, R. & Yu, H. **2002a**. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene*, 21, 7001-7010.
- Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., Dalton, W., Jove, R. & Yu, H. **1999**. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res*, 59, 5059-5063.
- Niu, G., Shain, K.H., Huang, M., Ravi, R., Bedi, A., Dalton, W.S., Jove, R. & Yu, H. **2001**. Overexpression of a dominant-negative signal transducer and activator of transcription 3 variant in tumor cells leads to production of soluble factors that induce apoptosis and cell cycle arrest. *Cancer Res*, 61, 3276-3280.
- Niu, G., Wright, K.L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., Heller, R., Ellis, L.M., Karras, J., Bromberg, J., Pardoll, D., Jove, R. & Yu, H. **2002b**. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 21, 2000-2008.
- Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, A.L. & Kitamura, T. **1999**. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *Embo J*, 18, 4754-4765.
- Nosaka, T., van Deursen, J.M., Tripp, R.A., Thierfelder, W.E., Witthuhn, B.A., McMickle, A.P., Doherty, P.C., Grosveld, G.C. & Ihle, J.N. **1995**. Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science*, 270, 800-802.
- Novak, A.J., Bram, R.J., Kay, N.E. & Jelinek, D.F. **2002**. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood*, 100, 2973-2979.

REFERENCIAS

- Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A.L., Gorman, D., McMahon, M., Miyajima, A. & Kitamura, T. **1998**. Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol Cell Biol*, 18, 3871-3879.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J.F. & Kastelein, R.A. **2000**. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 13, 715-725.
- Oscier, D.G., Gardiner, A.C., Mould, S.J., Glide, S., Davis, Z.A., Ibbotson, R.E., Corcoran, M.M., Chapman, R.M., Thomas, P.W., Copplestone, J.A., Orchard, J.A. & Hamblin, T.J. **2002**. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*, 100, 1177-1184.
- Oscier, D.G., Matutes, E., Copplestone, A., Pickering, R.M., Chapman, R., Gillingham, R., Catovsky, D. & Hamblin, T.J. **1997**. Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol*, 98, 934-939.
- Oscier, D.G., Stevens, J., Hamblin, T.J., Pickering, R.M., Lambert, R. & Fitchett, M. **1990**. Correlation of chromosome abnormalities with laboratory features and clinical course in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 76, 352-358.
- Oshiro, M.M., Landowski, T.H., Catlett-Falcone, R., Hazlehurst, L.A., Huang, M., Jove, R. & Dalton, W.S. **2001**. Inhibition of JAK kinase activity enhances Fas-mediated apoptosis but reduces cytotoxic activity of topoisomerase II inhibitors in U266 myeloma cells. *Clin Cancer Res*, 7, 4262-4271.
- Ostrand-Rosenberg, S., Clements, V.K., Terabe, M., Park, J.M., Berzofsky, J.A. & Dissanayake, S.K. **2002**. Resistance to metastatic disease in STAT6-deficient mice requires hemopoietic and nonhemopoietic cells and is IFN-gamma dependent. *J Immunol*, 169, 5796-5804.
- Ouchi, T., Lee, S.W., Ouchi, M., Aaronson, S.A. & Horvath, C.M. **2000**. Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5208-5213.
- Panayiotidis, P., Ganeshaguru, K., Foroni, L. & Hoffbrand, A.V. **1995**. Expression and function of the FAS antigen in B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Leukemia*, 9, 1227-1232.
- Panayiotidis, P., Jones, D., Ganeshaguru, K., Foroni, L. & Hoffbrand, A.V. **1996**. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol*, 92, 97-103.

REFERENCIAS

- Pardoll, D. **2003**. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*, 21, 807-839.
- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., Grosveld, G. & Ihle, J.N. **1998**. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*, 93, 385-395.
- Park, C., Li, S., Cha, E. & Schindler, C. **2000**. Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity*, 13, 795-804.
- Parker, W.B., Bapat, A.R., Shen, J.X., Townsend, A.J. & Cheng, Y.C. **1988**. Interaction of 2-halogenated dATP analogs (F, Cl, and Br) with human DNA polymerases, DNA primase, and ribonucleotide reductase. *Mol Pharmacol*, 34, 485-491.
- Pedersen, I.M., Kitada, S., Leoni, L.M., Zapata, J.M., Karras, J.G., Tsukada, N., Kipps, T.J., Choi, Y.S., Bennett, F. & Reed, J.C. **2002**. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood*, 100, 1795-1801.
- Peeters, P., Raynaud, S.D., Cools, J., Wlodarska, I., Grosgeorge, J., Philip, P., Monpoux, F., Van Rompaey, L., Baens, M., Van den Berghe, H. & Marynen, P. **1997**. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood*, 90, 2535-2540.
- Pendergast, A.M., Muller, A.J., Havlik, M.H., Maru, Y. & Witte, O.N. **1991**. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell*, 66, 161-171.
- Pepper, C., Bentley, P. & Hoy, T. **1996**. Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 95, 513-517.
- Pepper, C., Hoy, T. & Bentley, D.P. **1997**. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer*, 76, 935-938.
- Pettitt, A.R. **2003**. Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 121, 692-702.
- Pettitt, A.R., Sherrington, P.D. & Cawley, J.C. **2000**. Role of poly(ADP-ribosyl)ation in the killing of chronic lymphocytic leukemia cells by purine analogues. *Cancer Res*, 60, 4187-4193.
- Pickering, M.C., Botto, M., Taylor, P.R., Lachmann, P.J. & Walport, M.J. **2000**. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol*, 76, 227-324.
- Pindzola, J.A., Palazzo, J.P., Kovatich, A.J., Tuma, B. & Nobel, M. **1998**. Expression of p21WAF1/CIP1 in soft tissue sarcomas: a comparative immunohistochemical study with p53 and Ki-67. *Pathol Res Pract*, 194, 685-691.
- Plaza, R., Vidal, S., Rodriguez-Sanchez, J.L. & Juarez, C. **2004**. Implication of STAT1 and STAT3 transcription factors in the response to superantigens. *Cytokine*, 25, 1-10.
- Plosker, G.L. & Figgitt, D.P. **2003**. Oral fludarabine. *Drugs*, 63, 2317-2323.

REFERENCIAS

- Plunkett, W., Huang, P. & Gandhi, V. **1990**. Metabolism and action of fludarabine phosphate. *Semin Oncol*, 17, 3-17.
- Posner, I., Engel, M., Gazit, A. & Levitzki, A. **1994**. Kinetics of inhibition by tyrphostins of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor and analysis by a new computer program. *Mol Pharmacol*, 45, 673-683.
- Quelle, F.W., Shimoda, K., Thierfelder, W., Fischer, C., Kim, A., Ruben, S.M., Cleveland, J.L., Pierce, J.H., Keegan, A.D., Nelms, K. & et al. **1995**. Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. *Mol Cell Biol*, 15, 3336-3343.
- Raghoebier, S., van Krieken, J.H., Kluin-Nelemans, J.C., Gillis, A., van Ommen, G.J., Ginsberg, A.M., Raffeld, M. & Kluin, P.M. **1991**. Oncogene rearrangements in chronic B-cell leukemia. *Blood*, 77, 1560-1564.
- Rai, K.R., Dohner, H., Keating, M.J. & Montserrat, E. **2001**. Chronic lymphocytic leukemia: case-based session. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 140-156.
- Rai, K.R. & Keating, M.J. **2000**. *Chronic lymphocytic leukemia*. BC Decker Inc., Hamilton, Canada.
- Rai, K.R., Peterson, B.L., Appelbaum, F.R., Kolitz, J., Elias, L., Shepherd, L., Hines, J., Threatte, G.A., Larson, R.A., Cheson, B.D. & Schiffer, C.A. **2000**. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343, 1750-1757.
- Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N. & Pasternack, B.S. **1975**. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46, 219-234.
- Ram, P.A. & Waxman, D.J. **2000**. Role of the cytokine-inducible SH2 protein CIS in desensitization of STAT5b signaling by continuous growth hormone. *J Biol Chem*, 275, 39487-39496.
- Ramana, C.V., Gil, M.P., Schreiber, R.D. & Stark, G.R. **2002**. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol*, 23, 96-101.
- Ramana, C.V., Grammatikakis, N., Chernov, M., Nguyen, H., Goh, K.C., Williams, B.R. & Stark, G.R. **2000**. Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways. *Embo J*, 19, 263-272.
- Reed, J.C. **1998**. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*, 25, 11-18.
- Ringshausen, I., Schneller, F., Bogner, C., Hipp, S., Duyster, J., Peschel, C. & Decker, T. **2002**. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood*, 100, 3741-3748.
- Rizouli, V. & Gribben, J.G. **2003**. Role of autologous stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol*, 10, 306-311.
- Robak, T. **2004**. Monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphoid leukemias. *Leuk Lymphoma*, 45, 205-219.

REFERENCIAS

- Robertson, L.E., Chubb, S., Meyn, R.E., Story, M., Ford, R., Hittelman, W.N. & Plunkett, W. **1993**. Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9-beta-D-arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood*, 81, 143-150.
- Rodig, S.J., Meraz, M.A., White, J.M., Lampe, P.A., Riley, J.K., Arthur, C.D., King, K.L., Sheehan, K.C., Yin, L., Pennica, D., Johnson, E.M., Jr. & Schreiber, R.D. **1998**. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell*, 93, 373-383.
- Romano, M.F., Lamberti, A., Turco, M.C. & Venuta, S. **2000**. CD40 and B chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine: the influence of NF-kappaB/Rel transcription factors on chemotherapy-induced apoptosis. *Leuk Lymphoma*, 36, 255-262.
- Ross, T.S. & Gilliland, D.G. **1999**. Transforming properties of the Huntingtin interacting protein 1/platelet-derived growth factor beta receptor fusion protein. *J Biol Chem*, 274, 22328-22336.
- Rozenfeld-Granot, G., Toren, A., Amariglio, N., Brok-Simoni, F. & Rechavi, G. **2001**. Mutation analysis of the FAS and TNFR apoptotic cascade genes in hematological malignancies. *Exp Hematol*, 29, 228-233.
- Russell, S.M., Tayebi, N., Nakajima, H., Riedy, M.C., Roberts, J.L., Aman, M.J., Migone, T.S., Noguchi, M., Markert, M.L., Buckley, R.H. & et al. **1995**. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science*, 270, 797-800.
- Saharinen, P., Takaluoma, K. & Silvennoinen, O. **2000**. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol*, 20, 3387-3395.
- Sahni, M., Raz, R., Coffin, J.D., Levy, D. & Basilico, C. **2001**. STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. *Development*, 128, 2119-2129.
- Sandoval, A., Consoli, U. & Plunkett, W. **1996**. Fludarabine-mediated inhibition of nucleotide excision repair induces apoptosis in quiescent human lymphocytes. *Clin Cancer Res*, 2, 1731-1741.
- Sano, S., Itami, S., Takeda, K., Tarutani, M., Yamaguchi, Y., Miura, H., Yoshikawa, K., Akira, S. & Takeda, J. **1999**. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *Embo J*, 18, 4657-4668.
- Sano, S., Takahama, Y., Sugawara, T., Kosaka, H., Itami, S., Yoshikawa, K., Miyazaki, J., van Ewijk, W. & Takeda, J. **2001**. Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival. *Immunity*, 15, 261-273.
- Schimmer, A.D., Munk-Pedersen, I., Minden, M.D. & Reed, J.C. **2003**. Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol*, 4, 211-218.
- Schindler, C.W. **2002**. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest*, 109, 1133-1137.

REFERENCIAS

- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M. & Schaffner, W. **1989**. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res*, 17, 6419.
- Schuringa, J.J., Wojtachnio, K., Hagens, W., Vellenga, E., Buys, C.H., Hofstra, R. & Kruijer, W. **2001**. MEN2A-RET-induced cellular transformation by activation of STAT3. *Oncogene*, 20, 5350-5358.
- Schwaller, J., Frantsve, J., Aster, J., Williams, I.R., Tomasson, M.H., Ross, T.S., Peeters, P., Van Rompaey, L., Van Etten, R.A., Ilaria, R., Jr., Marynen, P. & Gilliland, D.G. **1998**. Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes. *Embo J*, 17, 5321-5333.
- Sekimoto, T., Nakajima, K., Tachibana, T., Hirano, T. & Yoneda, Y. **1996**. Interferon-gamma-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4. *J Biol Chem*, 271, 31017-31020.
- Seto, S., Carrera, C.J., Kubota, M., Wasson, D.B. & Carson, D.A. **1985**. Mechanism of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toxicity to nondividing human lymphocytes. *J Clin Invest*, 75, 377-383.
- Sexl, V., Piekorz, R., Moriggl, R., Rohrer, J., Brown, M.P., Bunting, K.D., Rothhammer, K., Roussel, M.F. & Ihle, J.N. **2000**. Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. *Blood*, 96, 2277-2283.
- Shankaranarayanan, P., Chaitidis, P., Kuhn, H. & Nigam, S. **2001**. Acetylation by histone acetyltransferase CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene. *J Biol Chem*, 276, 42753-42760.
- Shen, C.H. & Stavnezer, J. **1998**. Interaction of stat6 and NF-kappaB: direct association and synergistic activation of interleukin-4-induced transcription. *Mol Cell Biol*, 18, 3395-3404.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G., Paul, W.E. & Ihle, J.N. **1996**. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*, 380, 630-633.
- Simoncic, P.D., Lee-Loy, A., Barber, D.L., Tremblay, M.L. & McGlade, C.J. **2002**. The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr Biol*, 12, 446-453.
- Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W.J. & Jove, R. **2000**. Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene*, 19, 5419-5427.

REFERENCIAS

- Slee, E.A., O'Connor, D.J. & Lu, X. **2004**. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene*, 23, 2809-2818.
- Smith, P.D. & Crompton, M.R. **1998**. Expression of v-src in mammary epithelial cells induces transcription via STAT3. *Biochem J*, 331 (Pt 2), 381-385.
- Smithgall, T.E., Briggs, S.D., Schreiner, S., Lerner, E.C., Cheng, H. & Wilson, M.B. **2000**. Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene*, 19, 2612-2618.
- Snow, J.W., Abraham, N., Ma, M.C., Abbey, N.W., Herndier, B. & Goldsmith, M.A. **2002**. STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 99, 95-101.
- Socolovsky, M., Fallon, A.E., Wang, S., Brugnara, C. & Lodish, H.F. **1999**. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*, 98, 181-191.
- Song, J.I. & Grandis, J.R. **2000**. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene*, 19, 2489-2495.
- Sriuranpong, V., Park, J.I., Amornphimoltham, P., Patel, V., Nelkin, B.D. & Gutkind, J.S. **2003**. Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res*, 63, 2948-2956.
- Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., Jr. & Yancopoulos, G.D. **1995**. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*, 267, 1349-1353.
- Starostik, P., Manshour, T., O'Brien, S., Freireich, E., Kantarjian, H., Haidar, M., Lerner, S., Keating, M. & Albitar, M. **1998**. Deficiency of the ATM protein expression defines an aggressive subgroup of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*, 58, 4552-4557.
- Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A. & Hilton, D.J. **1997**. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387, 917-921.
- Sternberg, D.W. & Gilliland, D.G. **2004**. The role of signal transducer and activator of transcription factors in leukemogenesis. *J Clin Oncol*, 22, 361-371.
- Sternberg, D.W., Tomasson, M.H., Carroll, M., Curley, D.P., Barker, G., Caprio, M., Wilbanks, A., Kazlauskas, A. & Gilliland, D.G. **2001**. The TEL/PDGFBetaR fusion in chronic myelomonocytic leukemia signals through STAT5-dependent and STAT5-independent pathways. *Blood*, 98, 3390-3397.
- Strehlow, I. & Schindler, C. **1998**. Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *J Biol Chem*, 273, 28049-28056.

REFERENCIAS

- Sudbeck, E.A., Liu, X.P., Narla, R.K., Mahajan, S., Ghosh, S., Mao, C. & Uckun, F.M. **1999**. Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. *Clin Cancer Res*, 5, 1569-1582.
- Sun, X., Layton, J.E., Elefanty, A. & Lieschke, G.J. **2001**. Comparison of effects of the tyrosine kinase inhibitors AG957, AG490, and STI571 on BCR-ABL--expressing cells, demonstrating synergy between AG490 and STI571. *Blood*, 97, 2008-2015.
- Takahashi, Y., Carpino, N., Cross, J.C., Torres, M., Parganas, E. & Ihle, J.N. **2003**. SOCS3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. *Embo J*, 22, 372-384.
- Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I. & Akira, S. **1999**. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 10, 39-49.
- Takeda, K., Kaisho, T., Yoshida, N., Takeda, J., Kishimoto, T. & Akira, S. **1998**. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol*, 161, 4652-4660.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T. & Akira, S. **1997**. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3801-3804.
- Tallman, M.S. **2002**. Monoclonal antibody therapies in leukemias. *Semin Hematol*, 39, 12-19.
- Tallman, M.S. & Hakimian, D. **1995**. Purine nucleoside analogs: emerging roles in indolent lymphoproliferative disorders. *Blood*, 86, 2463-2474.
- Tanaka, N., Sato, M., Lamphier, M.S., Nozawa, H., Oda, E., Noguchi, S., Schreiber, R.D., Tsujimoto, Y. & Taniguchi, T. **1998**. Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Genes Cells*, 3, 29-37.
- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G. & Ihle, J.N. **1998**. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, 93, 841-850.
- ten Hoeve, J., de Jesus Ibarra-Sanchez, M., Fu, Y., Zhu, W., Tremblay, M., David, M. & Shuai, K. **2002**. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*, 22, 5662-5668.
- Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D.D., Carbone, D.P., Paul, W.E. & Berzofsky, J.A. **2000**. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol*, 1, 515-520.
- Thierfelder, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C. & Ihle, J.N. **1996**. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*, 382, 171-174.

REFERENCIAS

- Thomis, D.C., Gurniak, C.B., Tivol, E., Sharpe, A.H. & Berg, L.J. **1995**. Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science*, 270, 794-797.
- Tibbles, H.E., Vassilev, A., Wendorf, H., Schonhoff, D., Zhu, D., Lorenz, D., Waurzyniak, B., Liu, X.P. & Uckun, F.M. **2001**. Role of a JAK3-dependent biochemical signaling pathway in platelet activation and aggregation. *J Biol Chem*, 276, 17815-17822.
- Tomasson, M.H., Sternberg, D.W., Williams, I.R., Carroll, M., Cain, D., Aster, J.C., Ilaria, R.L., Jr., Van Etten, R.A. & Gilliland, D.G. **2000**. Fatal myeloproliferation, induced in mice by TEL/PDGFBetaR expression, depends on PDGFBetaR tyrosines 579/581. *J Clin Invest*, 105, 423-432.
- Trieu, V.N., Liu, R., Liu, X.P. & Uckun, F.M. **2000**. A specific inhibitor of janus kinase-3 increases survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 267, 22-25.
- Tsukada, N., Burger, J.A., Zvaifler, N.J. & Kipps, T.J. **2002**. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 99, 1030-1037.
- Turkson, J., Bowman, T., Adnane, J., Zhang, Y., Djeu, J.Y., Sekharam, M., Frank, D.A., Holzman, L.B., Wu, J., Sebt, S. & Jove, R. **1999**. Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. *Mol Cell Biol*, 19, 7519-7528.
- Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R.P. & Jove, R. **1998**. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol*, 18, 2545-2552.
- Turkson, J., Ryan, D., Kim, J.S., Zhang, Y., Chen, Z., Haura, E., Laudano, A., Sebt, S., Hamilton, A.D. & Jove, R. **2001**. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem*, 276, 45443-45455.
- Turnley, A.M., Faux, C.H., Rietze, R.L., Coonan, J.R. & Bartlett, P.F. **2002**. Suppressor of cytokine signaling 2 regulates neuronal differentiation by inhibiting growth hormone signaling. *Nat Neurosci*, 5, 1155-1162.
- Tussie-Luna, M.I., Bayarsaihan, D., Seto, E., Ruddle, F.H. & Roy, A.L. **2002**. Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family proteins and PIASxbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12807-12812.
- Uckun, F.M., Ek, O., Liu, X.P. & Chen, C.L. **1999**. In vivo toxicity and pharmacokinetic features of the janus kinase 3 inhibitor WHI-P131 [4-(4'hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline. *Clin Cancer Res*, 5, 2954-2962.
- Uckun, F.M., Roers, B.A., Waurzyniak, B., Liu, X.P. & Cetkovic-Cvrlje, M. **2002**. Janus kinase 3 inhibitor WHI-P131/JANEX-1 prevents graft-versus-host disease but spares the graft-versus-leukemia function of the bone marrow allografts in a murine bone marrow transplantation model. *Blood*, 99, 4192-4199.

REFERENCIAS

- Udy, G.B., Towers, R.P., Snell, R.G., Wilkins, R.J., Park, S.H., Ram, P.A., Waxman, D.J. & Davey, H.W. **1997**. Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7239-7244.
- Ulane, C.M., Rodriguez, J.J., Parisien, J.P. & Horvath, C.M. **2003**. STAT3 ubiquitylation and degradation by mumps virus suppress cytokine and oncogene signaling. *J Virol*, 77, 6385-6393.
- Ulloa, L., Doody, J. & Massague, J. **1999**. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature*, 397, 710-713.
- Ungureanu, D., Saharinen, P., Junttila, I., Hilton, D.J. & Silvennoinen, O. **2002**. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol*, 22, 3316-3326.
- Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Kotaja, N., Yang, J., Aittomaki, S., Janne, O.A., Palvimo, J.J. & Silvennoinen, O. **2003**. PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood*, 102, 3311-3313.
- Valdez, B.C., Henning, D., Perlaky, L., Busch, R.K. & Busch, H. **1997**. Cloning and characterization of Gu/RH-II binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 234, 335-340.
- Vallat, L., Magdelenat, H., Merle-Beral, H., Masdehors, P., Potocki de Montalk, G., Davi, F., Kruhoffer, M., Sabatier, L., Orntoft, T.F. & Delic, J. **2003**. The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays. *Blood*, 101, 4598-4606.
- Viallard, J.F., Mercie, P., Faure, I., Pellegrin, J.L. & Leng, B. **1999**. Successful treatment of lupus with fludarabine. *Lupus*, 8, 767-769.
- Vincent, A.M., Cawley, J.C. & Burthem, J. **1996**. Integrin function in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 87, 4780-4788.
- Vincent, P.W., Bridges, A.J., Dykes, D.J., Fry, D.W., Leopold, W.R., Patmore, S.J., Roberts, B.J., Rose, S., Sherwood, V., Zhou, H. & Elliott, W.L. **2000**. Anticancer efficacy of the irreversible EGFr tyrosine kinase inhibitor PD 0169414 against human tumor xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol*, 45, 231-238.
- Vinkemeier, U., Cohen, S.L., Moarefi, I., Chait, B.T., Kuriyan, J. & Darnell, J.E., Jr. **1996**. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *Embo J*, 15, 5616-5626.
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A.J. **2000**. Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 307-310.
- Wang, L.H., Kirken, R.A., Erwin, R.A., Yu, C.R. & Farrar, W.L. **1999**. JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *J Immunol*, 162, 3897-3904.
- Wang, L.H., Yang, X.Y., Mihalic, K., Xiao, W., Li, D. & Farrar, W.L. **2001**. Activation of estrogen receptor blocks interleukin-6-inducible cell growth of human multiple myeloma involving

REFERENCIAS

- molecular cross-talk between estrogen receptor and STAT3 mediated by co-regulator PIAS3. *J Biol Chem*, 276, 31839-31844.
- Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., Dalton, W., Jove, R., Pardoll, D. & Yu, H. **2004**. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*, 10, 48-54.
- Ward, A.C., Touw, I. & Yoshimura, A. **2000**. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*, 95, 19-29.
- Watson, C.J. & Miller, W.R. **1995**. Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer*, 71, 840-844.
- Weber-Nordt, R.M., Egen, C., Wehinger, J., Ludwig, W., Gouilleux-Gruart, V., Mertelsmann, R. & Finke, J. **1996**. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*, 88, 809-816.
- Wei, L.H., Kuo, M.L., Chen, C.A., Chou, C.H., Lai, K.B., Lee, C.N. & Hsieh, C.Y. **2003**. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*, 22, 1517-1527.
- Weisberg, E., Boulton, C., Kelly, L.M., Manley, P., Fabbro, D., Meyer, T., Gilliland, D.G. & Griffin, J.D. **2002**. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell*, 1, 433-443.
- Wen, R., Wang, D., McKay, C., Bunting, K.D., Marine, J.C., Vanin, E.F., Zambetti, G.P., Korsmeyer, S.J., Ihle, J.N. & Cleveland, J.L. **2001**. Jak3 selectively regulates Bax and Bcl-2 expression to promote T-cell development. *Mol Cell Biol*, 21, 678-689.
- Wen, Z., Zhong, Z. & Darnell, J.E., Jr. **1995**. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, 82, 241-250.
- Wilks, A.F., Harpur, A.G., Kurban, R.R., Ralph, S.J., Zurcher, G. & Ziemiecki, A. **1991**. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol*, 11, 2057-2065.
- Williams, J.F., Petrus, M.J., Wright, J.A., Husebekk, A., Fellowes, V., Read, E.J., Gress, R.E. & Fowler, D.H. **1999**. fas-mediated lysis of chronic lymphocytic leukaemia cells: role of type I versus type II cytokines and autologous fasL-expressing T cells. *Br J Haematol*, 107, 99-105.
- Williams, J.G. **1999**. Serpentine receptors and STAT activation: more than one way to twin a STAT. *Trends Biochem Sci*, 24, 333-334.
- Woessner, S., Asensio, A., Florensa, L., Pedro, C., Besses, C. & Sans-Sabrafen, J. **1994**. Expression of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 13, 457-461.

REFERENCIAS

- Wong, W.S. & Leong, K.P. **2004**. Tyrosine kinase inhibitors: a new approach for asthma. *Biochim Biophys Acta*, 1697, 53-69.
- Wu, T.R., Hong, Y.K., Wang, X.D., Ling, M.Y., Dragoi, A.M., Chung, A.S., Campbell, A.G., Han, Z.Y., Feng, G.S. & Chin, Y.E. **2002**. SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem*, 277, 47572-47580.
- Wyczechowska, D., Czyz, M. & Fabianowska-Majewska, K. **2000**. Evidence of inhibition of DNA methylation by fludarabine. *Adv Exp Med Biol*, 486, 349-353.
- Xu, W., Liu, L., Smith, G.C. & Charles, G. **2000**. Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-damaging anti-tumour agents. *Nat Cell Biol*, 2, 339-345.
- Yaish, P., Gazit, A., Gilon, C. & Levitzki, A. **1988**. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science*, 242, 933-935.
- Yamamoto, K., Quelle, F.W., Thierfelder, W.E., Kreider, B.L., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Silvennoinen, O. & Ihle, J.N. **1994**. Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *Mol Cell Biol*, 14, 4342-4349.
- Yan, R., Small, S., Desplan, C., Dearolf, C.R. & Darnell, J.E., Jr. **1996**. Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development. *Cell*, 84, 421-430.
- Yang, C. & Zhang, X. **1991**. Incidence survey of leukemia in China. *Chin Med Sci J*, 6, 65-70.
- Yeh, T.C., Dondi, E., Uze, G. & Pellegrini, S. **2000**. A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon-alpha signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8991-8996.
- Yoneda, T., Lyall, R.M., Alsina, M.M., Persons, P.E., Spada, A.P., Levitzki, A., Zilberstein, A. & Mundy, G.R. **1991**. The antiproliferative effects of tyrosine kinase inhibitors tyrphostins on a human squamous cell carcinoma in vitro and in nude mice. *Cancer Res*, 51, 4430-4435.
- Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G.S., Jackson, P., Groopman, J.D., Manning, J.E., Harris, C.C. & Herman, J.G. **2001**. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet*, 28, 29-35.
- Yu, C.L., Jove, R. & Burakoff, S.J. **1997**. Constitutive activation of the Janus kinase-STAT pathway in T lymphoma overexpressing the Lck protein tyrosine kinase. *J Immunol*, 159, 5206-5210.
- Yu, C.L., Meyer, D.J., Campbell, G.S., Larner, A.C., Carter-Su, C., Schwartz, J. & Jove, R. **1995**. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science*, 269, 81-83.
- Yu, H. & Jove, R. **2004**. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*, 4, 97-105.

REFERENCIAS

- Zhang, J.G., Farley, A., Nicholson, S.E., Willson, T.A., Zugaro, L.M., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Cary, D., Richardson, R., Hausmann, G., Kile, B.J., Kent, S.B., Alexander, W.S., Metcalf, D., Hilton, D.J., Nicola, N.A. & Baca, M. **1999**. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2071-2076.
- Zhang, J.J., Vinkemeier, U., Gu, W., Chakravarti, D., Horvath, C.M. & Darnell, J.E., Jr. **1996**. Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 15092-15096.
- Zhang, J.J., Zhao, Y., Chait, B.T., Lathem, W.W., Ritzi, M., Knippers, R. & Darnell, J.E., Jr. **1998**. Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1alpha in IFN-gamma-induced transcriptional activation. *Embo J*, 17, 6963-6971.
- Zhang, Q., Raghunath, P.N., Xue, L., Majewski, M., Carpentieri, D.F., Odum, N., Morris, S., Skorski, T. & Wasik, M.A. **2002a**. Multilevel dysregulation of STAT3 activation in anaplastic lymphoma kinase-positive T/null-cell lymphoma. *J Immunol*, 168, 466-474.
- Zhang, Y.W., Wang, L.M., Jove, R. & Vande Woude, G.F. **2002b**. Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene*, 21, 217-226.
- Zhao, H., Dugas, N., Mathiot, C., Delmer, A., Dugas, B., Sigaux, F. & Kolb, J.P. **1998**. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displaying anti-apoptotic activity. *Blood*, 92, 1031-1043.
- Zhao, Y., Wagner, F., Frank, S.J. & Kraft, A.S. **1995**. The amino-terminal portion of the JAK2 protein kinase is necessary for binding and phosphorylation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta c chain. *J Biol Chem*, 270, 13814-13818.
- Zhong, Z., Wen, Z. & Darnell, J.E., Jr. **1994**. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4806-4810.
- Zhou, Y.J., Hanson, E.P., Chen, Y.Q., Magnuson, K., Chen, M., Swann, P.G., Wange, R.L., Changelian, P.S. & O'Shea, J.J. **1997**. Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 13850-13855.
- Zhu, X., Wen, Z., Xu, L.Z. & Darnell, J.E., Jr. **1997**. Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. *Mol Cell Biol*, 17, 6618-6623.
- Zong, C.S., Zeng, L., Jiang, Y., Sadowski, H.B. & Wang, L.H. **1998**. Stat3 plays an important role in oncogenic Ros- and insulin-like growth factor I receptor-induced anchorage-independent growth. *J Biol Chem*, 273, 28065-28072.