

BASES MOLECULARS DE LA LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA I LA SEVA TERÀPIA

DOLORS COLOMER^{1,2}, BEATRIZ BELLOSILLO^{1,2}, GABRIEL PONS² I JOAN GIL²

¹*Unitat Hematopatologia. Hospital Clínic. *IDIBAPS.*

²*Departament de Ciències Fisiològiques II. Campus de Bellvitge. Universitat Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Unitat de Bioquímica. Feixa Llarga, s/n. 08907. L'Hospitalet de Llobregat.

RESUM

La leucèmia limfàtica crònica de tipus B (LLC-B) representa el 30-40 % de les leucèmies en els països occidentals i es caracteritza per l'acumulació de limfòcits B CD5⁺, que expressen uns alts nivells de Bcl-2. Anàlegs a les purines i inhibidors de la topoisomerasa II, han estat utilitzats com a agents quimioterapèutics en el tractament de la LLC-B. S'ha observat que tots ells actuen induint l'apoptosi de les cèl·lules de la LLC-B a través de l'activació de les caspases. També s'ha observat que l'aspirina i el salicilat poden induir l'apoptosi de les cèl·lules de la LLC-B mitjançant l'activació de les caspases i per mecanismes independents de la ciclooxigenasa.

SUMMARY

B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) accounts for 30- 40 % of all the leukemias in Western countries and is characterized by the accumulation of monoclonal CD5⁺ B lymphocytes that express high levels of Bcl-2. Purine analogues and inhibitors of the topoisomerase II have been used as a chemotherapeutic agents in the treatment of the B-CLL. All of them induce the apoptosis of B-CLL cells by activation of caspases. Aspirin and salicylate, also induce apoptosis of B-CLL cells by activation of caspases and this activation involves cyclooxygenase-independent mechanisms.

Keywords: B-chronic lymphocytic leukemia, apoptosis, caspases, bcl-2, chemotherapy.

INTRODUCCIÓ

La leucèmia limfàtica crònica de tipus B (LLC-B) es caracteritza per l'acumulació de limfòcits B d'aparença madura (petits amb un citoplasma escàs, nucli rodó, cromatina densa i nuclèols no visibles), però biològicament immadurs, i que presenten una vida mitjana molt prolongada (O'Brien *et al.*, 1995; Rozman *et al.*, 1995; Montserrat *et al.*, 1997). Tenen una producció d'anticossos deficient, per la qual cosa aquests malalts tenen una propensió a patir processos infecciosos.

En els països occidentals la LLC-B representa el 30 % de tots els casos de leucèmia i el 75 % de les leucèmies cròniques; en canvi en els països asiàtics només constitueix el 3-5 % de les leucèmies. Quant a sexes, la incidència és més alta en homes que en dones i es manifesta bàsicament en adults: l'edat mitjana és de 65 anys (Finch *et al.*, 1992).

Els malalts amb LLC-B presenten una malaltia estable durant molts anys. Ara bé, en un 10 % de malalts la malaltia progressa a formes més agressives: Síndrome de Richter, transformació prolimfocítica, leucèmia

aguda limfoblàstica i mieloma múltiple. (Foon *et al.*, 1988, 1990).

BIOLOGIA

Els limfòcits B de la LLC expressen la majoria dels antígens de superfície que presenten les cèl·lules B madures (CD19, CD20, CD21, CD24, i CD37, receptors Fc per a les immunoglobulines (Ig), l'antigen de classe II de l'HLA-DR) i alguns marcadors característics de cèl·lules immadures (receptors per a les hematies de ratolí i receptors per a la fracció C3dr del complement). La característica més important pel que fa al fenotip és l'expressió de CD5, i l'expressió de nivells baixos d'Igs de superfície. Aquestes Igs acostumen a ser IgM o bé IgM i IgD. Estan constituïdes per una única cadena pesada (μ o δ) i per una única cadena lleugera (κ o λ). L'anàlisi molecular de la cadena pesada del gen de les Ig, tant per Southern *blot* com per la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), demostra la presència de clonalitat (figura 1). La pèrdua de la banda germinal mitjançant Southern *blot* està

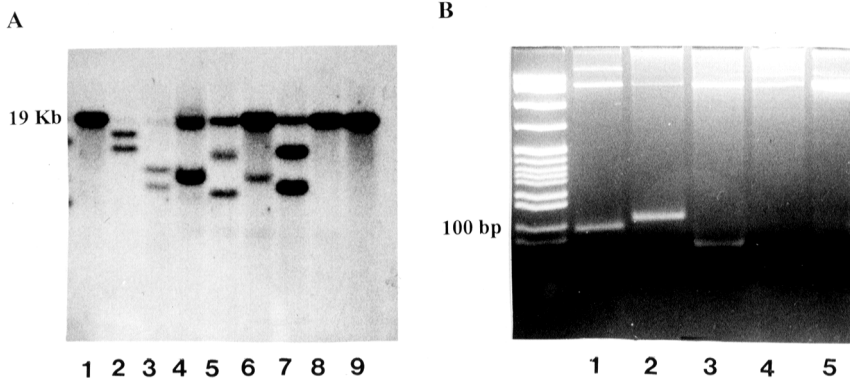


FIGURA 1. Anàlisi de clonalitat en la cadena pesada de les Ig.

A. Anàlisi de clonalitat mitjançant Southern *blot*. El DNA s'ha digerit amb Eco RI i s'ha hibridat amb una sonda de la regió d'unió de la cadena pesada de les Ig. Carrils 1, 8, 9: controls normals; carrils 2-7: LLC-B.

B. Anàlisi de clonalitat mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) de la regió CDRIII de la cadena pesada de les Ig. Carrils 1-3: LLC-B; carrils 4, 5: controls normals.

associada amb un estadi avançat de la malaltia (Hakim *et al.*, 1993). Molts casos de LLC-B expressen també antigens d'activació, com CD23, CD25 i receptors per a IL-2. Recentment s'ha descrit que la tirosina quinasa específica de cèl·lules T *Lck* s'expressa en les cèl·lules de LLC-B (Majolini *et al.*, 1998). Aquest patró d'expressió és semblant a les cèl·lules B CD5⁺, anomenades B1, de les zones del mantell dels teixits limfoides, de la cavitat peritoneal i del cordó umbilical. Tot i que no ha estat demostrat, es pensa que les cèl·lules de LLC-B s'originen per transformació de les cèl·lules normals B1 (Montserrat *et al.*, 1995, 1997; Jurlander, 1998).

La majoria de les cèl·lules es troben en fase G₀ del cicle cel·lular i responen poc als estímuls mitogènics. Això representa un asincronisme entre el fenotipus de les cèl·lules, que és propi de cèl·lules activades, i la situació al cicle cel·lular totalment quiescent (Caligaris-Capio *et al.*, 1993). Així, són cèl·lules difícils de transformar amb el virus d'Epstein-Barr (EBV), tot i que n'expressen el receptor (Rickinson *et al.*, 1982). A més tenen una marcada disminució del transportador Na⁺/K⁺ que és necessari per a la proliferació induïda per lipopolisacàrids (LPS) a les cèl·lules B normals. També es troben alteracions en les vies de transducció de senyals a través del receptor de l'antigen, i no presenten proliferació en resposta a anticossos anti- μ . Aquestes cèl·lules també tenen una resposta de calci defectuosa i una alte-

ració del patró de fosforilació de proteïnes (Foon *et al.*, 1990). L'activació de la proteïna quinasa C (PKC) amb esters de forbol induïx la diferenciació d'aquestes cèl·lules (Tötterman *et al.*, 1980). Els esters de forbol induïxen un ràpid desenvolupament d'Ig citoplasmàtiques i les cèl·lules experimenten canvis morfològics propis de les cèl·lules plasmacitoides, a més de presentar un gran nombre de canvis funcionals (Polliak, 1990; Colomer, 1990; Colomer *et al.*, 1991; Carballo, 1994; Carballo *et al.*, 1995, 1996).

ALTERACIONS GENÈTIQUES

En més del 50 % dels casos s'observen anomalies cromosòmiques (taula 1); les més freqüents són les delecions del cromosoma 13 a la banda q14 (Reed, 1998). El gen que queda afectat per aquesta delecio es desconeix, però es creu que és un gen supressor de tumors inactivat en la LLC-B. Es postula que aquest gen hauria de codificar alguna proteïna proapoptòtica que, quan es perd, augmenta la supervivència d'aquestes cèl·lules. Encara que el gen del retinoblastoma es localitza en aquesta zona i que en alguns malalts està delecionat, no sembla pas el gen involucrat en aquesta delecio (Bullrich *et al.*, 1996). Recentment s'han clonat dos gens candidats, anomenats *Leu1* i *Leu2*, que codifiquen proteïnes de 8 kD i 10 kD sense homologia amb cap proteïna coneguda (Liu *et al.*, 1997).

TAULA 1. Alteracions genètiques més significatives en la LLC-B

Alteració	Incidència	Efecte
Delecions 13q14	≈ 50 %	Inactivació d'algun gen supressor de tumors
Trisomia 12	≈ 35 %	Protooncogens?
Translocacions 18q21		
t(14;18); t(2;18); t(8;22)	≈ 1 - 4 %	Sobreexpressió Bcl-2
Translocacions 11q23*	≈ 0 - 5 %	Sobreexpressió Bcl-1
Alteracions 17p	≈ 5 %	Inactivació p53

* Poden tractar-se de limfomes de cèl·lules del mantell leucemitzats

La segona anomalia més freqüent és la trisomia 12. Es postula que el cromosoma 12 conté un protooncogen dominant o codominant que està actiu a la LLC-B i que codifica una proteïna antiapoptòtica. D'altra banda, la trisomia 12 està associada amb una progressió de la malaltia, amb una morfologia atípica i amb un pitjor pronòstic (Gahn *et al.*, 1997), per la qual cosa podria ser un gen relacionat amb el cicle cel·lular. L'oncogen *ras* es troba al cromosoma 12, però no s'han trobat mutacions de *ras* en cap pacient amb LLC-B.

També són molt comunes les addicions de material genètic al braç llarg d'alguns cromosomes (14q+, 13q+ i 11q+). A més, s'han descrit delecions del cromosoma 6 i del cromosoma 11 que apareixen en els estadis avançats de la malaltia (Juliusson *et al.*, 1993). Recentment s'ha observat que la del(11)q té un pitjor pronòstic (Neilson *et al.*, 1997). Aquesta zona de deleció 11q22.3-11q23 conté el gen *ATM* (*atàxia telangièctasi*), el gen *RDX* (*radixina*) i el gen *FDX1* (*ferredoxina 1*), però sembla que podria estar associada amb un *locus* d'algun nou gen supressor de tumors (Döhner *et al.*, 1997). La del(6)(q21q23) i les anomalies del cromosoma 14 (14q+) estan associades a un augment del nombre de prolifèrits.

S'han trobat mutacions de p53 (17p) en un 5 % dels malalts i en un 43 % en transformació de Richter (Newcomb *et al.*, 1995). Un 5 % de casos presenten la t(11;14)(q14;q32), involucrant el gen *bcl-1* (*PRAD-1*) en el cromosoma 11 i la cadena pesada de les Ig (Rosenberg *et al.*, 1991). El gen *bcl-1* codifica la ciclina D1, un membre de la família de les ciclines que participa en el cicle cel·lular. La ciclina D1 interacciona amb la cdk4 quinasa i la cdk6 i forma un complex que activa la quinasa i permet l'activació i desactivació del retinoblastoma (Rb). Així la t(11;14) dona lloc a una disregulació del gen *bcl-1* i una alteració en la proliferació d'aquestes

cel·lules. En l'actualitat es creu que aquestes formes de LLC-B podrien ser realment limfomes de cel·lules del mantell (LCM), que es caracteritzen per la presència de la t(11;14) i per ser molt més agressius que la LLC-B.

En un 1 % a 4 % dels casos s'observen translocacions entre la zona q21 del cromosoma 18, on es troba el gen *bcl-2*, amb un dels *locus* del gen de les Ig, al cromosoma 2 (cadena kappa), al cromosoma 14 (cadena pesada) o al cromosoma 22 (cadena lambda) (Raghoebier *et al.*, 1991). A la LLC-B les translocacions més freqüents són aquelles en què intervenen les cadenes lleugeres (kappa o lambda) (Adachi *et al.*, 1990). Això pot explicar-se pel fet que els reordenaments de les cadenes lleugeres tenen lloc en una fase més tardana que els de la cadena pesada, i les cel·lules de la LLC-B poden considerar-se en un estat més madur que les cel·lules dels limfomes fol·liculars (LF) caracteritzats per la presència de la t(14,18).

ALTERACIONS EN L'EXPRESSIÓ D'ONCOGENS

S'han descrit diferents anomalies en l'expressió d'oncogens en la LLC-B. En el 85 % dels casos s'observa una sobreexpressió de la ciclina D2 (CCND2) (Delmer *et al.*, 1995). També s'han descrit expressions anòmales dels protooncogens *lck* i *c-fgr*. Aquests protooncogens codifiquen proteïnes amb activitat tirosina quinasa, per la qual cosa també poden estar relacionats amb la patogènesi d'aquesta malaltia. S'ha estudiat que els limfòcits de la LLC-B presenten una gran heterogeneïtat en la resposta al receptor de cel·lules B (BCR). Les cel·lules amb molta poca resposta presenten un defecte en la fosforilació de residus de tirosina de molts substrats, especialment de fosfolipasa C γ . L'oncogen *A-myb* es troba sobreexpressat en

un 25 % dels casos (Golay *et al.*, 1996). En casos de progressió de la malaltia s'ha pogut observar sobreexpressió de l'oncogèn *c-myc*. (Montserrat *et al.*, 1997).

BCL-2 I APOPTOSI EN LES CÈL·LULES DE LLC-B

El gen *bcl-2* fou descobert en els limfomes no-Hodgkin's fol·liculars (LF) i codifica un potent inhibidor de l'apoptosi (Meijerink, 1997). En aquest aspecte els LF i la LLC-B són molt semblants; ambdues malalties es caracteritzen per una acumulació de cèl·lules B madures, en fase G₀. Tant en els LF com en la LLC-B s'observa una sobreexpressió del gen *bcl-2* tant en l'àmbit de RNA com de la proteïna. En més del 85 % dels casos de LF la t(14;18)(q32;q28) és la responsable de la disregulació del gen *bcl-2* i de la sobreexpressió de la proteïna.

En la LLC-B, un mecanisme implicat en aquesta sobreexpressió podria ser un augment de la transcripció degut a una hipometilació del gen (Hanada *et al.*, 1993), però ha d'haver-hi altres mecanismes ja que no hi ha una correlació entre el grau d'hipometilació i els nivells de proteïna. Tot i així, no es coneix si els alts nivells de *Bcl-2* observats en la LLC-B són deguts a la patogènesi de la malaltia o si és una característica de les cèl·lules CD5⁺. Així, les cèl·lules CD5⁺ de les zones del mantell tenen nivells alts de *Bcl-2*; en canvi les cèl·lules B fetals de cordó CD5⁺ tenen uns nivells inferiors de *Bcl-2* que les cèl·lules leucèmiques (Schena *et al.*, 1992). Moltes limfocines i factors de creixement poden regular els nivells de *Bcl-2* (Jurlander, 1998). Un gran nombre de citoquines han estat implicades en la patogènesi de la LLC-B. Així, el TNF- α (Reittie *et al.*, 1996), la IL-2 (Carlsson *et al.*, 1989) i la IL-15 (Trentin *et al.*, 1996) actuen com a factors de creixement; l'IFN- α , l'IFN- γ (Buschle *et al.*, 1993),

la IL-4 (Pu *et al.*, 1997) i el BFGF actuen com a inhibidors de l'apoptosi; la IL-5 i la IL-10 promouen l'apoptosi (Mainou-Fowler *et al.*, 1994; Kitabayashi *et al.*, 1995), i la IL-13 actua per ambdós mecanismes (Chaouchi *et al.*, 1996).

La forma en què el gen *bcl-2* promou la supervivència de les cèl·lules no es coneix. La proteïna Bcl-2 és una proteïna integral de membrana que té almenys dues possibles funcions: d'una banda podria actuar com un canal o proteïna transportadora, participant en el transport d'ions i de proteïnes, i d'altra banda té capacitat d'unir-se a proteïnes que estan relacionades directament o indirectament en la regulació de la mort cel·lular. Així, és capaç de captar proteïnes des del citosol a la membrana intracel·lular per inactivar-les o per posar-les en contacte amb altres proteïnes que es troben a la membrana (Reed, 1997). Bàsicament la seva funció principal és impedir l'activació d'unes proteïnes efectores de l'apoptosi, les cisteïna proteases que degraden les proteïnes en residus d'aspartat (*Cysteinyll Aspartate-specific proteases*: caspases), i aquesta funció la realitza impedit l'alliberament d'activadors de proteases des dels mitocondris o segregant la proteïna activadora de proteases CED-4/Apaf-1 que es troba al citosol (Salvensen *et al.*, 1997).

La família del Bcl-2 consta de 14 proteïnes. Algunes són inductores d'apoptosi (Bax, Bak, Bcl-X_s, Bad, Bid, Bik, Hrk) i les altres són inhibidores d'apoptosi (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1 i A1) (Reed, 1997). D'aquesta manera, la funció de la proteïna Bcl-2 és oposada a la d'altres proteïnes que tenen una gran homologia quant a la seqüència d'aminoàcids, com és el Bax. La proteïna Bax estructuralment és similar a Bcl-2 i pot formar heterodímers amb Bcl-2, encara que el significat d'aquest fet es descobreix (Zha *et al.*, 1997). Es postula que la proporció Bcl-2/Bax té un paper important

en l'homeòstasi de la LLC (McConkey *et al.*, 1996) i en la sensibilitat o resistència de la LLC-B als estímuls apoptòtics (Simonian *et al.*, 1997). Molt recentment s'han estudiat vuit proteïnes relacionades amb la regulació de l'apoptosi en la LLC-B i s'ha observat que Bcl-2, Mcl-1, BAG-1, Bax, Bak i Caspasa-3 s'expressen en la LLC-B, mentre que el Bcl-X_L i el BAD no s'expressen (Kitada *et al.*, 1998).

Fins al moment es coneix poc l'expressió i el mecanisme d'activació de les caspases a la LLC-B. El nostre grup ha analitzat la implicació de les caspases en l'apoptosi de les cèl·lules de la LLC-B. S'ha analitzat l'efecte de diferents factors que indueixen l'apoptosi en les cèl·lules de la LLC-B (dexametasona i fludarabina) sobre la proteòlisi de la *Poli(ADP-ribosa)-polimerasa* (PARP), un substrat de les caspases que s'utilitza com a marcador de la seva activació (Bellosillo *et al.*, 1997). La dexametasona va induir la proteòlisi de PARP en funció de la dosi i del temps d'incubació i es va observar que existia una correlació entre l'efecte citotòxic de la dexametasona i la degradació de la PARP. La fludarabina també va induir la proteòlisi de la PARP. La incubació de les cèl·lules amb TPA o amb IL-4, agents que inhibeixen l'apoptosi de les cèl·lules de LLC-B, va bloquejar la proteòlisi de la PARP induïda tant per dexametasona com per fludarabina (figura 2). Finalment, un inhibidor general de caspases, el Z-VAD.fmk, va inhibir tant la proteòlisi de la PARP com la fragmentació del DNA espontània i induïda per la dexametasona, a més de revertir l'efecte citotòxic d'aquest fàrmac. Aquests resultats i altres publicats posteriorment (Chandra *et al.*, 1997) demostren un paper important de les caspases en la inducció de l'apoptosi en cèl·lules de LLC-B.

També s'ha vist que l'apoptosi dels limfòcits B és regulada pels lligands dels receptors de la família de TNF α , que inclou

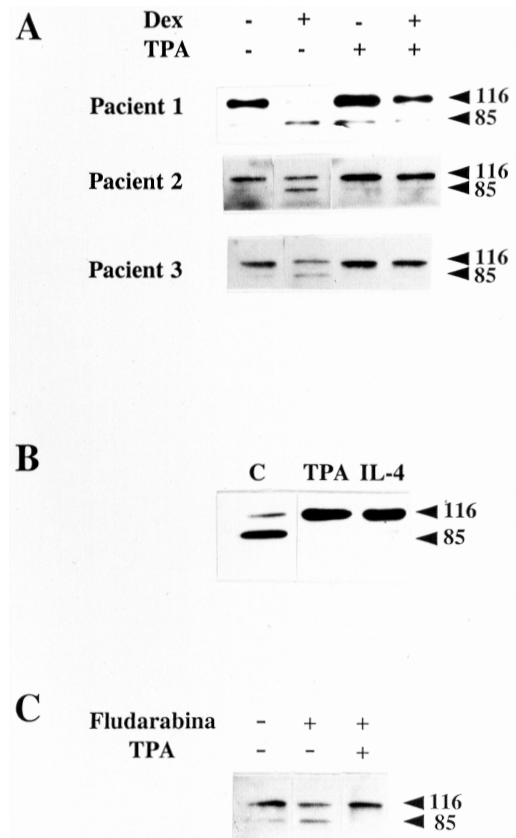


FIGURA 2. Inhibició de la proteòlisi de la PARP per TPA i IL-4. A. Inhibició per TPA de la proteòlisi de la PARP induïda per la dexametasona. Les cèl·lules de la LLC-B es varen incubar amb TPA 100 nmol/L en la presència o absència de 10 μ mol/L de dexametasona durant 48 hores. B. Inhibició de la proteòlisi espontània de la PARP. Les cèl·lules de la LLC-B es varen incubar durant 48 hores sense cap factor (C), amb 100 nmol/L de TPA o 10 ng/mL de IL-4. C. Inhibició per TPA de la proteòlisi de la PARP induïda per fludarabina. Les cèl·lules de la LLC-B es varen incubar amb TPA 100 nmol/L en la presència o absència de 5 μ g/mL de fludarabina durant 24 hores.

Fas i CD40. En el sistema Fas/FasL, la unió del lligand produeix la trimerització del receptor; a continuació hi ha la unió de les molècules adaptadores (FADD) i la unió de FLICE o caspasa-8. Aquesta, en ser activada, activarà a la vegada la cascada de les caspa-

ses. Tot i que Fas s'expressa en nivells baixos a la superfície dels limfòcits de LLC-B, l'activació de Fas indueix l'apoptosi d'aquestes cèl·lules (Mapara *et al.*, 1993; Panayiotidis *et al.*, 1995).

CD40 s'expressa en limfòcits B activats, i el lligand de CD40 (CD40L) s'expressa en els limfòcits T auxiliars. La interacció entre CD40L i CD40 evita l'apoptosi dels limfòcits B activats i regula la proliferació de les cèl·lules B, la producció d'Ig i la generació de limfòcits B memòria. Tant CD40 (Gruss *et al.*, 1995) com CD40L (Schattner *et al.* 1998) s'expressen en les cèl·lules de LLC-B i poden fer un paper important en la inhibició de l'apoptosi d'aquestes cèl·lules.

Una observació molt interessant publicada recentment és que les cèl·lules de LLC-B, però no les CD5⁺ de cordó umbilical, són rescatades de l'apoptosi per contacte amb les cèl·lules estromals normals (Lagneaux *et al.*, 1998).

TERÀPIA

Els pacients en els primers estadis de LLC-B generalment no són tractats, i els estudis realitzats mostren que els tractaments realitzats indueixen un retard en la progressió de la malaltia, però no se n'obté un benefici quant a la supervivència. Malalts en risc intermedi de la malaltia o bé els pacients en un estadi avançat de la malaltia necessiten tractament (Montserrat *et al.*, 1997). Tots els agents quimioterapèutics emprats i la irradiació per raigs X sembla que actuen induint l'apoptosi de les cèl·lules (Reed, 1995).

Els agents quimioterapèutics més utilitzats en el tractament de la LLC-B són el clorambucil (CLB) i la prednisona. També s'han utilitzat règims de poliquimioteràpia: COP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona), CAP (ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona), CMP (ciclofosfamida, melfa-

lan, prednisona), CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona), però no milloren la supervivència observada amb el clorambucil (Montserrat *et al.*, 1997).

Els anàlegs de nucleòsids han demostrat una gran eficàcia en el tractament de la LLC-B. La fludarabina és un anàleg de la desoxiadenosina que presenta un àtom de fluor a la posició 2. El tractament amb fludarabina *in vivo* ha produït un gran nombre de respostes parcials i totals, bàsicament en malalts no tractats (Keating *et al.*, 1989; Sorensen, *et al.*, 1997). La fludarabina s'administra com a derivat monofosfat i es defosforila ràpidament en el plasma, entra a la cèl·lula per algun transportador i allí es fosforila mitjançant la desoxicitidina quinasa a la forma F-ara-adenosina trifosfat (F-ara-ATP), que és el metabòlit actiu. El F-ara-ATP és resistent a la desaminació produïda per l'adenosina desaminasa, i això fa que s'acumuli a la cèl·lula i doni lloc a la supressió de la síntesi de DNA deguda a la inhibició de la ribonu-

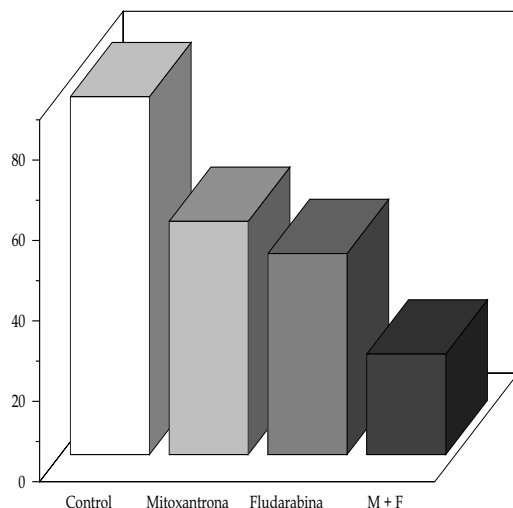


FIGURA 3. Efecte citotòxic de la mitoxantrona i la fludarabina en la LLC-B.

Les cèl·lules de la LLC-B es varen incubar a 37 °C durant 48 hores en absència de cap factor (control), amb mitoxantrona (0,5 µg/mL), amb fludarabina (5 µg/mL) o amb la combinació de les dues (M + F).

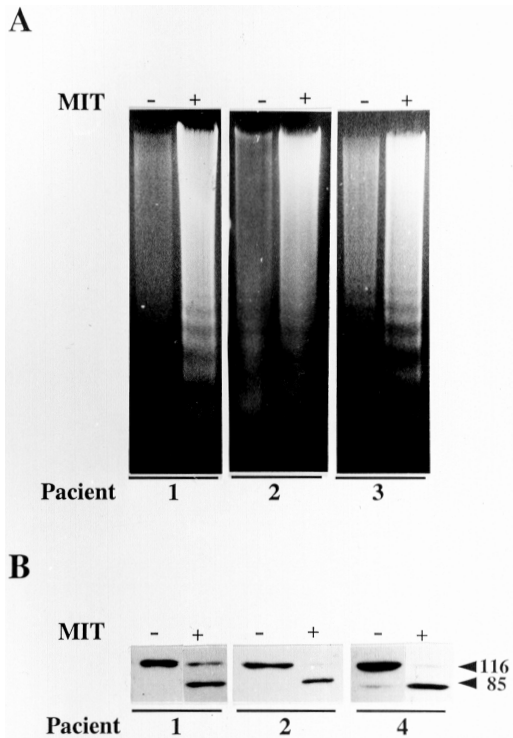


FIGURA 4. Inducció de l'apoptosi per mitoxantrona en la LLC-B.

A. Efecte de la mitoxantrona (MIT) en la fragmentació del DNA. Cèl·lules de tres pacients amb LLC-B foren incubades durant 24 hores amb 0,5 µg/mL de mitoxantrona.

B. Efecte de la mitoxantrona (MIT) en la proteòlisi de la PARP. Cèl·lules de tres pacients amb LLC-B foren incubades durant 48 hores amb 0,5 µg/mL de mitoxantrona.

cleòtid reductasa i la DNA polimerasa α . En les síndromes limfoproliferatives cròniques, l'índex de proliferació és molt baix, per la qual cosa no es coneix bé quin és el mecanisme d'acció pel qual s'indueix citotoxicitat. La fludarabina induïx l'apoptosi de les cèl·lules de LLC (Robertson *et al.*, 1993), possiblement com a conseqüència de la inhibició de la reparació del DNA i de la síntesi de RNA.

La mitoxantrona és una antracenediona que s'intercala amb el DNA i inhibeix la topoisomerasa II. La topoisomerasa II és l'en-

zim encarregat de canviar la topologia del DNA mitjançant la unió covalent de l'enzim al DNA i la formació de talls en la doble cadena del DNA. La mitoxantrona bloqueja aquest enzim en el moment que s'han produït els talls en la cadena de DNA. Hem estudiat l'efecte de la mitoxantrona sobre les cèl·lules de la LLC-B (Bellosillo *et al.*, 1998), i hem observat un efecte citotòxic. D'altra banda, es va observar un efecte additiu en combinar la mitoxantrona amb la fludarabina (5 µg/mL), i també un efecte sinèrgic en alguns malalts (figura 3). La mitoxantrona va produir la degradació del DNA i la proteòlisi de la PARP en tots els malalts estudiats i va demostrar que l'efecte citotòxic observat era degut a una inducció de l'apoptosi (figura 4). També s'ha observat que la doxorubicina, un altre inhibidor de la topoisomerasa II, produïa els mateixos efectes que la mitoxantrona.

La ciclofosfamida és un agent alquilant que es metabolitza en el fetge per la citocrom P-450 i genera el derivat hidroxilat 4-OH-ciclofosfamida. *In vitro* s'utilitza la ma-

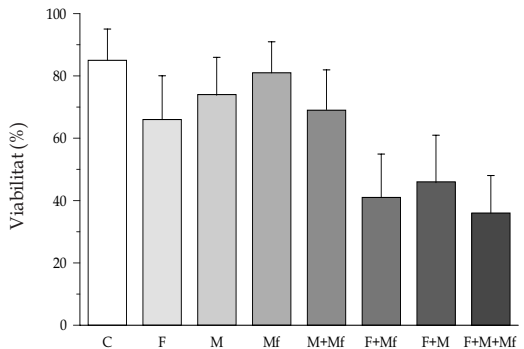


FIGURA 5. Efecte citotòxic de la combinació fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona en la LLC-B.

Les cèl·lules de la LLC-B varen ser incubades a 37°C durant 48 hores sense cap factor (control), amb fludarabina (F) (1 µg/ml), mitoxantrona (M) (0,5 µg/ml), mafosfamida (Mf) (1 µg/ml) o amb la combinació d'aquestes drogues. La viabilitat està expressada en tant per cent respecte a la viabilitat de cèl·lules control a l'inici del cultiu. Les dades mostren la mitjana \pm SD de tres cultius independents.

fosfamida, un derivat de la ciclofosfamida, que en dissolució aquosa s'hidrolitza i genera 4-OH-ciclofosfamida. De vint-i-un malalts estudiats, la mafosfamida produeix un efecte citotòxic inferior a la fludarabina o la mitoxantrona. Ara bé, la combinació de la mafosfamida amb fludarabina va produir un efecte sinèrgic molt important (figura 5), fet que suggereix una possible utilitat terapèutica d'aquesta combinació de drogues en el tractament de la LLC-B.

També s'han utilitzat dos altres anàlegs a les purines: la pentostatina (2-desoxicoformicina) (DCF) i la 2-clorodesoxiadenosina (2-CDA) i ambdues també indueixen l'apoptosi de les cèl·lules de la LLC-B (Carrera *et al.*, 1991; Zinzani *et al.*, 1994).

Molt recentment s'ha observat que el melarsoprol, un derivat de l'arseni format per un complex d'òxid de melarsen amb el dimercaprol, una droga quelant de metalls, indueix apoptosi a les cèl·lules de la LLC-B i que aquest efecte està associat amb una pèrdua de l'expressió de bcl-2 tant de l'mRNA com de la proteïna; en canvi el As_2O_3 no té cap efecte (König *et al.*, 1997).

També hem analitzat l'efecte de l'aspirina, el salicilat i altres fàrmacs del grup dels antiinflamatoris no esteroïdals (AINE) sobre la viabilitat de les cèl·lules de la LLC-B (Bellosillo *et al.*, 1998). L'aspirina va produir una disminució en la viabilitat en funció de la dosi i del temps (figura 6). La IC_{50} en cinc malalts fou de $5,9 \pm 1,13$ mmol/L. No es va observar cap efecte citotòxic emprant altres AINE com són el ketorolaco, la indometacina o l'NS-398, la qual cosa suggereix que l'efecte de l'aspirina està mitjançat per mecanismes independents de la ciclooxigenasa. El salicilat va produir efectes semblants a l'aspirina i la IC_{50} fou de $6,96 \pm 1,13$ mmol/L. Tant l'aspirina com el salicilat van produir la proteòlisi de la PARP i la fragmentació del DNA. Aquests efectes foren bloquejats per l'inhibidor Z-VAD.fmk, cosa que indica

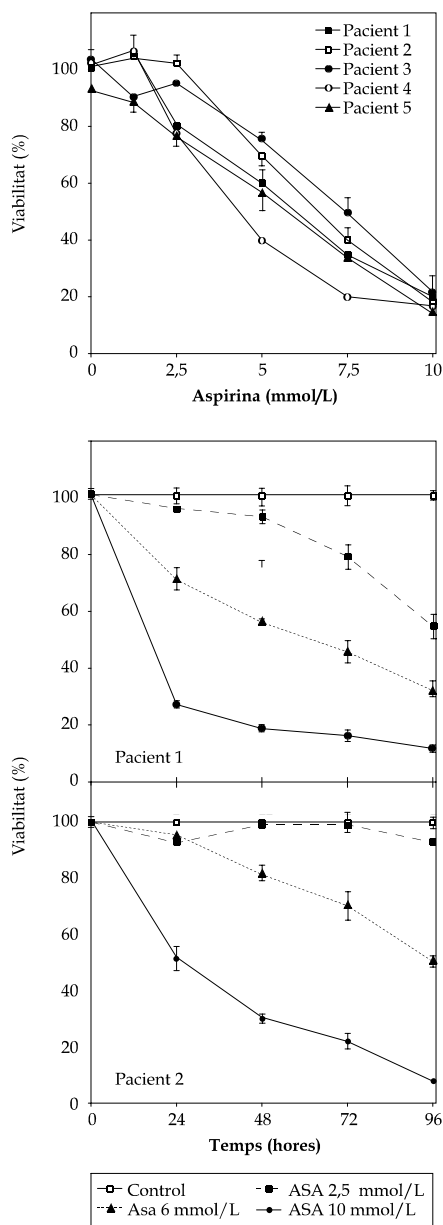


FIGURA 6. Efecte citotòxic de l'aspirina en la LLC-B.

A. Dosi-resposta de l'efecte citotòxic de l'aspirina en la LLC-B. Les cèl·lules es varen incubar durant 48 hores amb diferents concentracions d'aspirina (1–10 mmol/L).

B. Efecte citotòxic de l'aspirina en la LLC-B en funció del temps. Cèl·lules de dos pacients amb LLC-B es varen incubar amb concentracions d'aspirina (ASA) 2,5 i 10 mmol/L durant els temps indicats.

per tant que l'aspirina i el salicilat indueixen l'apoptosi de les cèl·lules de la LLC-B a través de l'activació de les caspases i per mecanismes independents de la ciclooxigenasa.

CONCLUSIONS

L'estudi clínic de l'efectivitat dels règims terapèutics exigeix un període llarg de temps i pot ser ineficaç o fins i tot perillós per causa de les complicacions. Una manera de superar aquestes dificultats és l'avaluació de la quimiosensibilitat a les diferents drogues o combinació d'elles *in vitro*. Aquests estudis *in vitro* permeten, a més, estudiar el mecanisme pel qual aquestes drogues indueixen citotoxicitat en les cèl·lules de LLC-B i esperem que siguin d'utilitat per al disseny de noves terapèutiques efectives i racionals de la LLC-B.

BIBLIOGRAFIA

- ADACHI, M.; A. TEFFERI; P. R. GREIPP; T. J. KIPPS; Y. TSUJIMOTO (1990). «Preferential linkage of Bcl-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia». *J. Exp. Med.*, núm. 171, pàg. 559-564.
- BELLOSILLO, B.; M. DALMAU; D. COLOMER, J. GIL (1997). «Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells». *Blood*, núm. 89, pàg. 3378-3384.
- BELLOSILLO, B.; D. COLOMER, G. PONS; J. GIL (1998). «Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells». *Br. J. Haematol.*, núm. 100, pàg. 142-146.
- BELLOSILLO, B.; M. PIQUÉ; M. BARRAGÁN; E. CASTAÑO; N. VILLAMOR; D. COLOMER, E. MONTSERRAT; G. PONS; J. GIL (1998). «Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-chronic lymphocytic leukemia cells». *Blood*, núm. 92, pàg. 1406-1414.
- BULLRICH, F.; M. L. VERONESE; S. KITADA; J. JURLANDER; M. A. CALIGIURI; J. C. REED; C. M. CROCE. (1996). «Minimal region of loss at 13q14 in B-chronic lymphocytic leukemia». *Blood*, núm. 88, pàg. 3109-3115.
- BUSCHLE, M.; D. CAMPANA; S. R. CARDING; C. RICHARD; A. V. HOFFBRAND; M. K. BRENNER (1993). «Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia». *J. Exp. Med.*, núm. 77, pàg. 213-218.
- CALIGARIS-CAPPIO, F. D.; A. ALFARANO; A. STACCHINI; M. G. GREGORETTI; P. GHI; M. T. BERTERO; A. NOVARINO; L. BERGUI (1993). «The nature of B lymphocyte in B-chronic lymphocytic leukemia». *Blood cells*, núm. 19, pàg. 610-613.
- CARBALLO, E. (1994). *Papel de la proteína quinasa C y de la fosforilación de proteínas en la leucemia linfática crónica de tipo B*. Tesi doctoral, UB.
- CARBALLO, E.; D. COLOMER; J. L. VIVES CORRONS; P. J. BLACKSHEAR; J. GIL (1995). «Phosphorylation of the MARCKS family of protein kinase C substrates in human B chronic lymphocytic leukemia cells». *Leukemia*, núm. 9, pàg. 834-839.
- CARBALLO, E.; D. COLOMER; J. L. VIVES CORRONS; P. J. BLACKSHEAR; J. GIL (1996). «Characterization and purification of a protein kinase C substrate in human B cells». *J. Immunol.*, núm. 156, pàg. 1709-1713.
- CARLSSON, M.; T. H. TOTTERMAN; A. ROSEN; K. NILSSON (1989). «Interleukin-2 and a T cell hybridoma (MP6) derived B cell-stimulatory factor act synergistically to induce proliferation and differentiation of human B-chronic lymphocytic leukemia cells». *Leukemia*, núm. 3, pàg. 593-601.
- CARRERA, C. J.; L. D. PIRO; A. SAVEN; E. BEUTLER; C. TERAI; D. A. CARSON (1991). «2-Chlorodeoxyadenosine chemotherapy triggers programmed cell death in normal and malignant lymphocytes». *Adv. Exp. Med. Biol.*, núm. 309^a, pàg. 15-18.
- CHANDRA, J.; J. GILBREATH; E. J. FREIREICH; K. O. KLICHE; M. ANDREEFF; M. KEATING; D. J. MCCONKEY (1997). «Protease activation is required for glucocorticoid-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemic lymphocytes». *Blood*, núm. 90, pàg. 3673-3681.
- CHAOUCHI, N.; C. WALLON; C. GOJJARD; G. TERTIAN; A. RUDENT; D. CAPUT; P. FERRERA; A. MINTY; A. VÁZQUEZ; J. F. DELFRAISSY (1996). «Interleukin-13 inhibits interleukin-2-induced proliferation and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from *in vitro* apoptosis». *Blood*, núm. 87, pàg. 1022-1029.
- COLOMER, D. (1990). *Efectes de l'èster de forbol TPA en els limfòcits normals i en la leucèmia linfàtica crònica de tipus B*. Tesi doctoral, UB.
- COLOMER, D.; J. L. VIVES CORRONS; R. BARTRONS (1991). «Effect of TPA on fructose 2,6-biphosphate levels and protein kinase C activity in B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)». *Biochim. Biophys. Acta.*, núm. 1097, pàg. 3270-3274.
- DELMER, A.; F. AJCHEBAUM-CYMBALISTA; R. TANG; S. RAMOND; A. M. FAUSSAT; J. P. MARIE; R. ZITTOUN (1995). «Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies». *Blood*, núm. 85, pàg. 2870-2876.
- DÖHNER, H.; S. STILGENBAUER; M. R. JAMES; A. BENNER; T. WEILGUNI; M. BENTZ; K. FISCHER; W. HUNSTEIN (1997).

- «11q deletions a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis». *Blood*, núm. 89, pàg. 2516-2522.
- FINCH, S. C.; M. S. LINET (1992). «Chronic leukaemias». *Baillière's Clin Haematol.*, núm. 5, pàg. 27-56.
- FOON, K. A.; R. P. GALE (1988). «Clinical transformation of chronic lymphocytic leukemia». *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, núm. 30, pàg. 385-388.
- FOON, K. A.; K. R. RAI; R. P. GALE (1990). «Chronic lymphocytic leukemia: new insights into biology and therapy». *Ann. Int. Med.*, núm. 113, pàg. 525-539.
- GAHN, B.; C. SHAFER; J. NEEF; C. TROFF; M. FEURING-BUSKE; W. HIDDEMANN; B. WORMANN (1997). «Detection of trisomy 12 and RB-deletion in CD34+ cells of patients with B-chronic lymphocytic leukemia». *Blood*, núm. 89, pàg. 4274-4281.
- GOLAY, J.; M. LUPPI; S. SONGIA; C. PALVARINI; L. LOMBARDI; A. AIELLO; D. DELIA; K. LAM; D. H. CRAWFORD; A. BIONDI; T. BARBUI; A. RAMBALDI, M. INTRONA (1996). «Expression of A-myb, but not C-myb and B-myb is restricted to Burkitt's lymphoma, slg⁺ B-acute lymphoblastic leukemia, and a subset of chronic lymphocytic leukemia». *Blood*, núm. 87, pàg. 1900-1911.
- GRUSS, H. J.; S. K. DOWER (1995). «Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas». *Blood*, núm. 85, pàg. 3378-3404.
- HAKIM, I.; G. REHAVI; F. BROK-SIMONI; Z. GROSSMAN; N. AMARIGLIO; M. MANDEL; B. RAMOT; I. BEN-BASSAT; N. KATZIR (1993). «Analysis of rearranged immunoglobulin genes indicating a process of clonal evolution in chronic lymphocytic leukaemia». *Br. J. Haematol.*, núm. 84, pàg. 436-442.
- HANADA, M.; D. DELIA; A. AIELLO; E. STADTMAUER; J. C. REED (1993). «Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia». *Blood*, núm. 82, pàg. 1820-1828.
- JULIUSSON, G.; G. GAHRTON (1993). «Cytogenetics in CLL and related disorders». *Baillière's Clin Haematol.*, núm. 6, pàg. 821-848.
- JURLANDER, J (1998). «The cellular biology of B-cell chronic lymphocytic leukemia». *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, núm. 27, pàg. 29-52.
- KAUFMANN, S. H.; S. DESNOYERS; Y. OTTAVIANO; N. E. DAVIDSON; G. G. POIRIER (1993). «Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis.» *Cancer Res.*, núm. 53, pàg. 3976-3985.
- KEATING, M. J.; H. KANTARJIAN; M. TALPAZ; R. J. REDMAN; H. KOLLER; B. BARLOGIE; W. VELASQUEZ; W. PLUNKETT; E. J. FREIREICH; K. B. MCCREDIE (1989). «Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia». *Blood*, núm. 74, pàg. 19-25.
- KITABAYASHI, A.; M. HIROKAWA; A. B. MIURA (1995). «The role of interleukin-10 (IL-10) in chronic B-lymphocytic leukemia: IL-10 prevents leukemic cells from apoptotic cell death». *Int. J. Hematol.*, núm. 62, pàg. 99-106.
- KITADA, S.; J. ANDERSEN; S. AKAR; J. M. ZAPATA; S. TAKAYAMA; S. KRAJEWSKI; H. G. WANG; X. ZHANG; F. BULLRICH; C. M. CROCE; K. RAI; J. HINES; J. C. REED (1998). «Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses». *Blood*, núm. 91, pàg. 3379-3389.
- KÖNIG, A.; L. WRZEL; R. P. WARRELL; R. RIVI; P. P. PANDOLFI; A. JAKUBOWSKI; J. L. GABRILOVE (1997). «Comparative activity of melarsoprol and arsenic trioxide in chronic B-cell leukemia lines». *Blood*, núm. 90, pàg. 562-570.
- LAGNEAUX, L.; A. DELFORGE; D. BRON; C. DE BRUYN; P. STRYCKMANS (1998). «Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells». *Blood*, núm. 91, pàg. 2387-2396.
- LIU, Y.; M. CORCORAN; O. RASOOL; G. IVANOVA; R. IBBOTSON; D. GRANDER; A. YENCAR; A. BARANOVA; V. KASHUBA; M. MERUP; X. WU; A. GARDINER; R. MULLENBACH; A. POLTARAU; A. L. HULSTROM; G. JULIUSSON; R. CHAPMAN; M. TILLER; F. COTTER; G. GAHRTON; N. YANKOVSKY; E. ZABAROVSKY; S. EINHORN; D. OSCIER (1997). «Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia». *Oncogene*, núm. 15, pàg. 2463-2473.
- MAINOU-FOWLER, T.; V. A. CRAIG; J. A. COPPLESTONE; M. D. HAMON; A. G. PRENTICE (1994). «Interleukin-5 (IL-5) increases spontaneous apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro independently of bcl-2 expression and is inhibited by IL-4». *Blood*, núm. 84, pàg. 2297-2304.
- MAJOLINI, M. B.; M. M. D'ELIOS; P. GALIENI; M. BONCRISTIANO; F. LAURIA; G. DEL PRETE; J. L. TELFORD; C. T. BALDARI (1998). «Expression of the T-cell-specific tyrosine kinase lck in normal B-1 cells and in chronic lymphocytic leukemia B cells». *Blood*, núm. 91, pàg. 3390-3396.
- MAPARA, M. Y.; R. BARGOU; C. ZUGCK; H. DOHNER; F. USTAOGU; R. R. JONKER; P. H. KRAMMER; B. DORKEN (1993). «APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression». *Eur. J. Immunol.*, núm. 23, pàg. 702-708.
- MCCONKEY, D. J.; J. CHANDRA; S. WRIGHT; W. PLUNKETT; T. J. McDONNELL; J. C. REED; M. KEATING (1996). «Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of Bcl-2 and Bax». *J. Immunol.*, núm. 156, pàg. 2624-2630.
- MEIJERINK, J. P. P (1997). «t(14;18), a journey to eternity». *Leukemia*, núm. 11, pàg. 2175-2187.

- MONTERRAT, E.; C. ROZMAN (1995). «Chronic lymphocytic leukemia: Present status». *Ann. Oncol.*, núm. 6, pàg. 219-235.
- MONTERRAT, E.; F. BOSCH; C. ROZMAN (1997). «B-cell chronic lymphocytic leukemia: Recent progress on biology, diagnosis, and therapy». *Ann. Oncol.*, núm. 8, pàg. 93-101.
- NEILSON, J. R.; R. AUER; D. WHITE; N. BIENZ; J. J. WATERS; J. A. WHITTAKER; D. W. MILLIGAN; C. D. FEGAN (1997). «Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival». *Leukemia*, núm. 11, pàg. 1929-1932.
- NEWCOMB, E. W.; L. S. RAO; S. S. GIKNAVORIAN; L. Y. LEE (1995). «Alterations of multiple suppressor genes (p53 (17p13), p16INKA (9p21) and DBM (13q14) in B-cell chronic lymphocytic leukemia». *Mol. Carcinog.*, núm. 14, pàg. 141-146.
- NEWCOMB, E. W.; S. EL ROUBY; A. THOMAS (1995). «A unique spectrum of p53 mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia distinct from that of other lymphoid malignancies». *Mol. Carcinog.*, núm. 14, pàg. 227-232.
- O'BRIEN, S.; A. GIGLIO; M. KEATING (1995). «Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia». *Blood*, núm. 85, pàg. 307-318.
- PANAYIOTIDIS, P.; K. GANESHAGURU; L. FORONI; A. V. HOFFBRAND (1995). «Expression and function of the FAS antigen in B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia». *Leukemia*, núm. 9, pàg. 1227-1232.
- POLLIAK, A (1990). «12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) and its effect on leukaemic cells, in vitro. A review». *Leuk. Lymph.*, núm. 3, pàg. 173-182.
- PU, Q. Q.; W. R. BEZWODA (1997). «Interleukin-4 prevents spontaneous in vitro apoptosis in chronic lymphatic leukaemia but sensitizes B-CLL cells to melphalan cytotoxicity». *Br. J. Haematol.*, núm. 98, pàg. 413-417.
- RAGHOEBIER, S.; J. H. VAN KRIEKEN; J. C. KLUIN-NELEMANS; A. GILLIS; G. J. VAN OMMEN; A. M. GINSBERG; M. RAFFELD; P. M. KLUIN (1991). «Oncogene rearrangements in chronic B-cell leukemia». *Blood.*, núm. 77, pàg. 1560-1564.
- REED, J. C (1995). «Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance». *Curr. Opin. Oncol.*, núm. 7, pàg. 541-546.
- REED, J. C (1997). «Double identity for proteins of the Bcl-2 family». *Nature*, núm. 387, pàg. 773-776.
- REED, J. C (1998). «Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia». *Sem. Oncol.*, núm. 25, pàg. 11-18.
- REITTE, J. E.; K. L. YONG; P. PANAYIOTIDIS; A. V. HOFFBRAND (1996). «Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumour necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia». *Leuk. Lymphoma.*, núm. 22, pàg. 83-90.
- RICKINSON, A. B.; S. FINERTY; M. A. EPSTEIN (1982). «Interaction of Epstein-Barr virus with leukaemic cells in vitro. I. Abortive infection and rare cell line establishment from chronic lymphocytic leukemic cells». *Clin. Exp. Immunol.*, núm. 50, pàg. 347-354.
- ROBERTSON, L. E.; S. CHUBB; R. E. MEYN; M. STORY; R. FORD; W. N. HITTELMAN; W. PLUNKETT (1993). «Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9-β-D-arabinosyl-2-fluoradenine». *Blood*, núm. 81, pàg. 143-150.
- ROSENBERG, C. L.; E. WONG; E. M. PETTY; A. E. BALE; Y. TSUJIMOTO; N. L. HARRIS; A. ARNOLD (1991). «PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: Mapping and expression in centrocytic lymphoma». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 88, pàg. 9638-9642.
- ROZMAN, C.; E. MONTERRAT (1995). «Chronic lymphocytic leukemia». *N. Engl. J. Med.*, núm. 333, pàg. 1052-1057.
- SALVENSEN, G. S.; V. M. DIXIT (1997). «Caspases: intracellular signaling by proteolysis». *Cell*, núm. 91, pàg. 443-446.
- SCHATTNER, E. J.; J. MASCARENHAS; I. REYFMAN; M. R. Y. KOSHY; C. WOO; S. M. FRIEDMAN; M. K. CROW (1998). «Chronic lymphocytic leukemia B cells can express CD40 ligand and demonstrate T-cell type costimulatory capacity». *Blood*, núm. 91, pàg. 2689-2697.
- SCHENA, M.; L. G. LARSSON; D. GOITARDI; G. GAIDANO; M. CARLSSON; K. NILSSON; F. CALIGARIS-CAPPIO (1992). «Growth-and differentiation-associated expression of *bcl-2* in B-chronic lymphocytic leukemia cells». *Blood*, núm. 79, pàg. 2981-2989.
- SIMONIAN, P. L.; D. A. M. GRILLOT; G. NUÑEZ (1997). «Bcl-2 and Bcl-XL can differentially block chemotherapy-induced cell death». *Blood*, núm. 90, pàg. 1208-1216n.
- SORENSEN, J. M.; D. A. VENA; A. FALLAVOLLITA; H. G. CHUN; B. D. CHESON (1997). «Treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia with fludarabine phosphate via the group C protocol mechanism of the National Cancer Institute: five-year follow-up report». *J. Clin. Oncol.*, núm. 15, pàg. 458-465.
- TÖTTERMAN, T. H.; K. NILSSON; C. SUNDSTROM (1980). «Phorbol ester induced differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells». *Nature*, núm. 288, pàg. 176-178.
- TRENTIN, L.; A. CERUTTI; R. ZAMBELLO; R. SANCRETTA; C. TASSINARI; M. FACCO; F. ADAMI; F. RODEGHIERO; C. AGOSTINI; G. SEMENZATO (1996). «Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders». *Blood.*, núm. 87, pàg. 3327-3335.
- ZHA, J.; H. HARADA; K. OSIPOV; J. JOCKEL; G. WAKSMAN; S. J. KORSMEYER (1997). «BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and

pro-apoptotic activity». *J. Biol. Chem.*, núm. 272, pàg. 24101-24104.
ZINZANI, P. L.; P. TOSI; G. VISANI; G. MARTINELLI; P. FARABEGOLI; M. BUZZI; E. OTTAVIANI; M. SALVUCCI; M. BEN-

DANDI; A. ZACCARIA-A; S. TURA (1994). «Apoptosis induction with three nucleoside analogs on freshly isolated B-chronic lymphocytic leukemia cells». *Am. J. Hematol.*, núm. 47, pàg. 301-306.