

Niveles séricos del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I como posible marcador de la evolución de pacientes con leucemia linfática crónica

Schillaci, Roxana¹; Becu-Villalobos, Damasia¹; Galeano, Adriana²; Sapia, Sandra²; Bezares, Raimundo F.³

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental CONICET, ²Laboratorio de Patología Sanatorio Mater Dei, y ³Hospital Municipal Teodoro Alvarez, Buenos Aires, Argentina.

Correspondencia: Dra. Roxana Schillaci, Instituto de Biología y Medicina Experimental CONICET, Vuelta de Obligado 2490, (1428) Buenos Aires, Argentina; TE: 5411-4783-2869; FAX: 5411-4786-2564; e-mail: rschilla@dna.uba.ar

Trabajo premiado en el XVII Congreso Argentino de Hematología, 60° Aniversario de la SAH - III Congreso Internacional de Citometría de Flujo - VIII Jornadas Científicas del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo

Fecha de recepción: 21/2/06
Fecha de aceptación: 18/3/06



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 10 N° 1: 13-19
Enero-Abril, 2006

RESUMEN

La leucemia linfática crónica (LLC) es una enfermedad caracterizada por la acumulación de linfocitos B, usualmente CD5+, que tienen una larga vida y se encuentran detenidos en la fase G_{0/1} temprana del ciclo celular debido a un defecto en su apoptosis. Como el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) es un conocido factor antiapoptótico en diferentes tipos celulares, hemos investigado su posible participación autocrina/paracrina en las células leucémicas. Observamos que los niveles de IGF-I séricos en pacientes con LLC fueron elevados mientras que la hormona de crecimiento (HC) se mantuvo normal. Las células LLC expresaron el ARNm del IGF-I y fueron capaces de secretar el factor de crecimiento *in vitro*. Por lo tanto, la producción local del IGF-I puede ser responsable del aumento de los niveles séricos de IGF-I, de forma independiente de la HC y podría estar relacionada al control autocrino/paracrina de la supervivencia de los linfocitos. Más aun, los pacientes estables que tuvieron IGF-I sérico elevado, mostraron una sobrevida más corta en un seguimiento de 4 años. Nuestros hallazgos indican que los niveles séricos de IGF-I en pacientes estables podrían ser utilizados como un marcador pronóstico en LLC.

Palabras claves: Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I, leucemia linfática crónica, pronóstico

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfática crónica (LLC) es una enfermedad caracterizada por la acumulación de linfocitos B, usualmente CD5+, que tienen una larga vida y se encuentran detenidos en la fase G_{0/1} temprana del ciclo celular. Esta neoplasia parece estar causada por la prolongada sobrevida del clon maligno, más que por un aumento de su actividad proliferativa. Debi-

do a la frecuente resistencia de las células leucémicas a los quimioterápicos, la LLC sigue siendo una enfermedad incurable¹. El curso clínico de los pacientes con LLC puede ser muy variable: muchos pacientes permanecen estables por años, mientras otros mueren dentro del año del diagnóstico². A pesar que los dos principales sistemas de estadificación para la LLC han provisto una invaluable información acerca de la heterogeneidad clínica^{3,4}, es todavía difícil predecir si el paciente cursará una enfermedad indolente o agresiva si pertenece a las categorías de riesgo bajo o intermedio. Por esa razón, actualmente se incluyen otras determinaciones como el tiempo de duplicación de linfocitos, la expresión de CD38 y, más recientemente, la mutación somática en la porción variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina clonal (IgVH) y la expresión de la proteína quinasa ZAP-70^{5,6}. De esta manera el estudio de nuevos parámetros pronósticos que puedan identificar el grupo de pacientes que cursarán una enfermedad progresiva y requerirán terapia, representa un poderoso campo de investigación.

Los factores de crecimiento pueden participar en forma autocrina o paracrina afectando el crecimiento o supervivencia de las células LLC a través de la inducción de genes relacionados a la apoptosis⁷. Existe gran evidencia que apoya la participación del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) como factor antiapoptótico en diferentes tipos celulares⁸. El IGF-I es un polipéptido de 7.8 kDa miembro de la familia del gen de la insulina⁹, el cual es principalmente producido por los hepatocitos en respuesta al estímulo de la hormona de crecimiento

(HC). Sin embargo, también se produce localmente en varios tejidos donde puede actuar en forma autocrina/paracrina¹⁰. El producto de la transcripción de su gen consiste en seis exones. El extremo N-terminal del exón 4 codifica para el péptido E, que está presente sólo en la hormona sin procesar. En humanos el péptido E toma una de dos formas, según el exón 4 empalme con el exón 5 (formándose la región Eb) o con el exón 6 (formándose la región Ea). La proteína del IGF-I que se traduce del ARNm Ea produce efectos autocrinos/paracrinos en los tejidos no hepáticos, mientras que el IGF-I que se traduce del ARNm Eb es expresado principalmente en el hígado bajo la estimulación de la HC¹¹. El IGF-I es producido por las células estromales de médula ósea y está involucrado, como un factor paracrino, en la diferenciación de linfocitos normales pro-B a pre-B, estimulando la expresión citoplasmática de la cadena pesada μ ¹². El IGF-I participa en el mantenimiento de células hematopoyéticas por aumento de la proliferación de las células progenitoras¹³ y previniendo la apoptosis de células privadas de IL-3¹⁴. Por otra parte, el receptor de IGF-I (IGF-IR) se expresa en linfocitos B maduros y en sus precursores comprometidos, mientras que es indetectable en células CD34+.

Está ampliamente aceptado que el IGF-I y su receptor están involucrados en la génesis del cáncer. La expresión de IGF-IR es un prerrequisito para el desarrollo de muchos tumores pues facilita la transformación por oncogenes virales y celulares¹⁷. La síntesis de IGF-I también se ha reportado en algunos tumores y puede actuar como un factor autocrino que contribuye a la malignidad¹⁸. Un creciente número de hallazgos han asociado altas concentraciones de IGF-I circulantes con un riesgo incrementado a contraer cáncer de mama¹⁹ o próstata²⁰, estableciendo al IGF-I como un posible factor predictivo de contraer cáncer. La mayoría de estas evidencias provienen de pacientes que desarrollaron tumores sólidos. A pesar que la LLC es la leucemia más común del adulto en los países de Occidente²¹, no hay reportes acerca de la expresión y función del IGF-I es esta enfermedad. Recientemente hemos demostrado que el 44% de los pacientes con LLC expresan en sus células leucémicas la proteína del IGF-IR y el 59% de ellos, su ARNm. Más aun, encontramos que la expresión del IGF-IR se correlacionó de forma directa con la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y con la supervivencia de las células LLC *in vitro*²².

El principal logro del presente estudio fue determinar los niveles séricos de IGF-I y HC en pacientes con LLC y en controles e investigar la síntesis de IGF-I por las células leucémicas. Estos datos fueron correlacionados con el estadio de los pacientes, la expresión de CD38 y la progresión de la enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes y controles

Este estudio involucró 26 pacientes que reunieron los criterios clínicos, morfológicos e inmunofenotípicos (CD19+, CD5+, CD23+ y expresión débil clonal de inmunoglobulinas de superficie) de LLC²³. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de pacientes que dieron su consentimiento y estaban libres de tratamiento (n=19) o 7 de ellos lo habían tenido entre 4-30 meses (18.7 ± 3.8 meses) antes de la toma de la muestra. El protocolo de investigación fue aprobado por los Comités de Ética correspondientes. Las características de los pacientes se muestran en la tabla I. Los pacientes se consideraron estables (n=16) cuando permanecieron en el estado original, sin ningún síntoma constitutivo (fiebre sin causa aparente, pérdida de peso mayor del 10% en 6 meses o diaforesis nocturna), sin incremento en adeno ni esplenomegalia y un tiempo de duplicación de linfocitos mayor de 12 meses. Los pacientes con al menos uno de estos signos o síntomas fueron considerados progresivos (n=10).

También se colectaron muestras de sangre de 17 individuos sanos, de edad y sexo semejante a los pacientes, que fueron utilizados como controles.

Análisis por citometría de flujo

Los leucocitos fueron obtenidos por lisis con cloruro de amonio de la sangre anticoagulada con heparina y fueron incubados con un panel de anticuerpos para su inmunotipificación (anti-CD10 conjugado con isotiocianato de fluoresceína [FITC], anti-CD5 conjugado con ficoeritrina [PE], anti-CD20 conjugado con PE o FITC, anti-CD22 conjugado con PE,

TABLA I
Características de los pacientes

Características	
Número de pacientes	26
Promedio de edad	$68,5 \pm 1,4^a$
Rango	55-80
Sexo (número y porcentaje)	
Varones	17 (66,7)
Mujeres	9 (33,3)
Estadio Binet (número y porcentaje)	
A	15 (59,5)
B	6 (22,2)
C	5 (18,3)
Tratamiento	
No tratado	19 (73,1)
Tratado	7 (26,9)

^aPromedio \pm ES

anti-CD23 conjugado con PE, anti-CD38 conjugado con FITC y anti-CD45 conjugado con la proteína peridina clorofila (PerCP) todos de BD Biosciences, San Diego, CA; anti-FMC7 conjugado con FITC, anti-CD79b conjugado con PE, y anti-CD19 conjugado con PE-cianina 5 (PECy5) de Immunotech, Marsella, France; anti-cadenas livianas kappa y anti-lambda conjugadas con FITC fueron de Dako, Ely, UK). La marcación de las células se realizó incubando 10^6 leucocitos con distintas combinaciones de los mencionados anticuerpos (por ejemplo: CD38-FITC, CD5-PE y CD19 PECy5) durante 30 min. Luego las células fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) y se determinó la fluorescencia utilizando un citómetro FACScan (BD Biosciences) analizando 10^4 por muestra utilizando el programa Cellquest (BD Biosciences). En todos los pacientes, más del 98% de las células de las células CD19+ fueron clonales.

Separación y cultivo de LLC y linfocitos B

Las células LLC y linfocitos B de los controles se separaron por la técnica Rosette-Sep (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). La sangre haparizada fue incubada con 50 μ l del reactivo Rosette Sep para enriquecimiento de linfocitos B humanos por ml de sangre durante 20 min a temperatura ambiente. Este reactivo consiste en un *cocktail* de anticuerpos tetraméricos dirigidos contra linfocitos T, monocitos, NK y glóbulos rojos el cual permite la formación de rosetas entre los glóbulos rojos y las células antes mencionadas, permitiendo la purificación de linfocitos B por selección negativa. Luego de la incubación, la sangre es diluida con un volumen igual de PBS + 2% suero fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY) y separada por gradiente de densidad utilizando Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway). Las células se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en un medio libre de suero Dulbecco's: Ham F12 (1:1 v/v) (Gibco) suplementado con 10 μ g/ml transferrina humana, 50 μ M 2-mercaptoetanol, 2.5 nmol/l selenito de sodio, 20 μ mol/l etanolamina, 2 mmol/l l-glutamina, 30 μ g/ml gentamicina (Sigma St. Louis), como previamente describimos²⁴. La suspensión así obtenida contenía 98.0–99.5% de células B, determinadas por citometría de flujo utilizando anti-CD19 como marcador de linaje.

Determinación del ARNm del IGF-I por RT-PCR

El ARN total se preparó a partir de 10^7 células purificadas LLC o linfocitos B controles utilizando el reactivo Trizol (Gibco) y la transcripción reversa (RT) fue realizada con 1 μ g de ARN en un volumen de reacción de 25 μ l, según el método de Quinn y

col.²⁵. Los fragmentos transcritos del ADN copia (ADNc) se amplificaron en un volumen de reacción de 50 μ l con 100 μ M de cada dNTP, 0.4 μ M del correspondiente *primer* y 1 U *Taq* ADN polimerasa (Promega Corp., Madison, WI). La amplificación se realizó en un ciclador Eppendorf Master Cycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Los fragmentos transcritos del ADNc se amplificaron con primers para la secuencia Ea del IGF-I humano que fueron las siguientes: (F) 5'-GTGGATGCTCTTCAGTTCGTGTGT G-3' y (R) 5'-TGGCATGTCACCTTTCCTCC-3'²⁶. Los primers para la glicero-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) fueron los siguientes: (F) 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGG AT TTG-3' and (R) 5'-CACCACCTGGAGTACCGGG TGTAC-3'²⁷. Las condiciones de amplificación para Ea IGF-I y G3PDH ADNc fueron: dos ciclos de desnaturalización a 94°C por 2 min, anillado a 62°C por 2 min y extensión a 72°C por 5 min, seguido de 28 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, anillado a 62°C por 1 min, y extensión a 72°C por 1 min, como lo describimos previamente²⁸. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1.8% y fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio bajo transiluminación ultravioleta. Se utilizó un marcador de 100 pares de bases (Gibco) para verificar los tamaños de los productos de PCR. La identidad de los fragmentos fue confirmada por clivaje con la enzima de restricción *Pst*1.

Determinación de IGF-I en medios condicionados y suero de pacientes

Las células LLC y linfocitos B controles purificados se cultivaron durante 48 h a una concentración de 2×10^6 cell/ml en medio libre de suero Dulbecco's: Ham F12 (1:1) suplementado como se describió arriba. El medio condicionado fue colectado, centrifugado y congelado a -70 °C. Para aislar suero, las muestras de sangre periférica se colectaron en tubos secos y luego de su coagulación, se centrifugaron y el suero fue guardado -70 °C. Para la determinación de IGF-I por RIA, las muestras de suero, los medios condicionados y los estándares de IGF-I, se sometieron a una técnica de crioprecipitación en medio ácido-etanol, como fue previamente descrito por Breier y col.²⁹. El IGF-I fue determinado utilizando el anticuerpo (UB2-495) provisto por los doctores L. Underwood y J. J. Van Wyk, y distribuidos por Hormone Distribution Program of the National Institute of Diabetes and Digestive, and Kidney Diseases. El IGF-I recombinante humano (producido por fermentación bacteriana, Sigma) fue usado con radioligando y ligando no marcado. El IGF-I fue marcado radioactivamente por el método de cloramina-T³⁰. Los coeficientes de variación intra e inter

ensayo fueron 7.2% y 12.8%, respectivamente. La sensibilidad del ensayo fue de 6 pg/tubo. La cantidad de IGF-I en el medio Dulbecco's: Ham F12 suplementado no expuesto a las células fue 0.06 ± 0.01 ng/ml y fue restado de las concentraciones de IGF-I obtenidas de los medios condicionados.

Determinación de HC

El suero fue colectado como se describió previamente para la determinación de IGF-I. Para la determinación de HC se utilizó un kit comercial fluorimétrico basada en el reconocimiento de dos anticuerpos monoclonales (Delfia Human GH, Euro/DPC, Gwynedd, UK). La fluorescencia fue analizada en el analizador Immulite (DPC, Los Angeles, CA). El límite de detección fue de 0.1 ng/ml y el coeficiente de variación intra e inter-ensayo fue de 5.8% y 8.4%, respectivamente.

Análisis estadístico

Los resultados están expresados como media \pm error estándar (ES). Las comparaciones entre grupos

fue realizada por ANOVA. La sobrevida de los pacientes fue analizada por el test de Chi cuadrado.

RESULTADOS

Niveles séricos de IGF-I

En primer término, evaluamos los niveles séricos de IGF-I en pacientes con LLC y controles. La Fig. 1A muestra que la media de los niveles séricos de IGF-I en pacientes con LLC fue de 265 ± 20 ng/ml. Estos niveles fueron significativamente mayores a los detectados en los controles (170 ± 12 ng/ml, $P < 0.0019$), siendo estos últimos similares a los previamente reportados como valores controles³¹. Cuando analizamos estos los datos agrupando a los pacientes según la clasificación Binet (Fig. 1B), observamos que el IGF-I está incrementado en todos los estadios: estadio A 294 ± 31 ng/ml, estadio B 238 ± 27 ng/ml, estadio C 251 ± 34 ng/ml ($P < 0.0004$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, relativo al grupo control)²².

Niveles séricos de HC

Los niveles séricos del IGF-I son producidos principalmente por los hepatocitos en respuesta a la

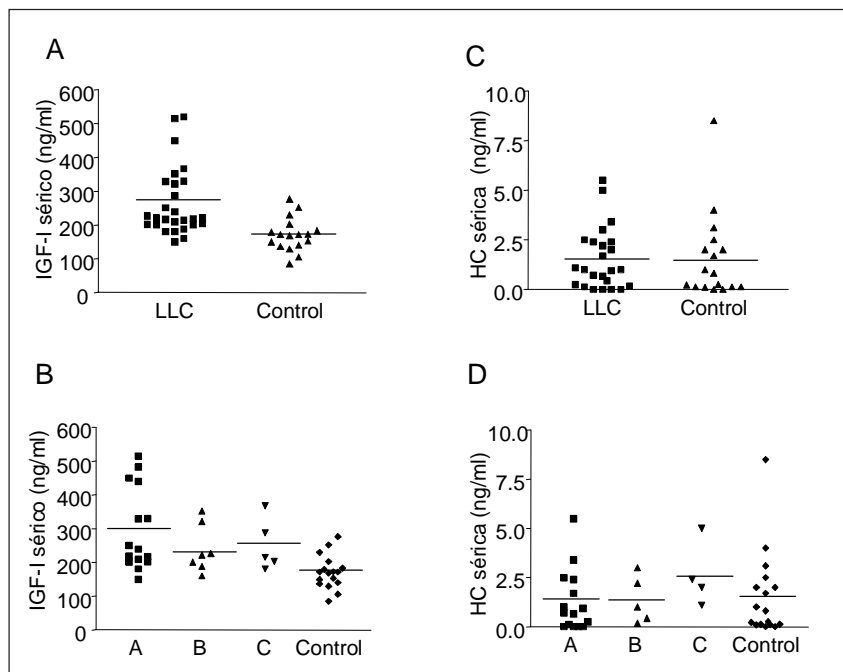


Figura 1: Niveles de IGF-I y HC en suero de pacientes con LLC y controles. Las determinaciones de IGF-I fueron realizadas por RIA y las de HC por Delfia (A) IGF-I sérico de 26 pacientes con LLC (265 ± 20 ng/ml) y 17 controles (170 ± 11 ng/ml) $P < 0.0019$. (B) IGF-I sérico en pacientes con LLC clasificado según Binet y controles. Binet A (294 ± 31 ng/ml), Binet B (238 ± 27 ng/ml), Binet C (251 ± 34 ng/ml) vs controles (170 ± 11 ng/ml) $P < 0.0004$, $P < 0.01$, $P < 0.01$ respectivamente. (C) HC sérica en 24 pacientes con CLL y 17 controles (D) HC sérica en pacientes con CLL clasificado según Binet y controles Las líneas sólidas horizontales indican el promedio. Los resultados se expresan como media \pm ES.

estimulación de HC. Por ello exploramos los niveles de HC en el suero de pacientes y controles. En la figura 1C se muestra que los niveles de HC fueron similares en controles y en pacientes con LLC (1.5 ± 0.3 ng/ml vs. 1.5 ± 0.5 ng/ml, respectivamente). Similares resultados fueron obtenidos cuando los datos se analizaron de acuerdo a los estadios de Binet (Fig. 1D)²².

Expresión del ARNm del IGF-I y síntesis del IGF-I por células LLC

Si bien el IGF-I circulante es principalmente secretado por el hígado, otros tejidos también lo sintetizan³². Para determinar si el IGF-I puede actuar en forma autocrina, utilizamos una RT-PCR para determinar si las células LLC son capaces de expresar el ARNm del IGF-I Ea. En la Fig. 2 se muestra la presencia del ARNm del IGF-I Ea en 19/22 muestras. En todos los casos, cuando el IGF-I sérico fue elevado, se detectó su ARNm en las células LLC²².

Como las células LLC expresan ARNm del IGF-I, nos propusimos determinar si son capaces de secretar dicho factor. Para ello, purificamos células LLC de nueve pacientes que expresaban el ARNm el IGF-I, o linfocitos B controles, los cultivamos durante 48 h en medio libre de suero y colectamos los sobrenadantes para determinar la presencia de IGF-I por RIA. Los niveles de IGF-I en los medios condicionados de las células LLC fueron significativamente mayores que los controles: 0.42 ± 0.06 ng/ml y 0.19 ± 0.07 ng/ml respectivamente ($P < 0.05$).

Niveles séricos de IGF-I en pacientes con LLC y progresión de la enfermedad

Luego analizamos los niveles séricos obtenidos de los pacientes respecto a la clasificación en estables ($n=16$) y progresivos ($n=10$). En la Fig. 3 A se observa que los niveles de IGF-I fueron de 294 ± 25 y de 234 ± 32 ng/ml en los estables y progresivos respectivamente, habiendo diferencia significativa en los estables vs controles ($P < 0.001$). Luego exploramos el curso de la enfermedad de aquellos pacientes diagnosticados inicialmente como estables. En ellos observamos dos grupos: uno con niveles elevados de IGF-I (394 ± 28 ng/ml; $n=8$) y otro con niveles normales (218 ± 15 ng/ml; $n=8$). Definimos como pacientes con niveles elevados de IGF-I a aquellos cuyo valor es mayor a la media más tres desvíos estándar del grupo control (>313.7 ng/ml). En el grupo con IGF-I elevado se encuentran 4 pacientes fallecidos (Fig. 3 B), 2 bajo tratamiento y 3 sin tratamiento, mientras que en el grupo con IGF-I normal ningún paciente requirió tratamiento alguno y los pacientes mantie-

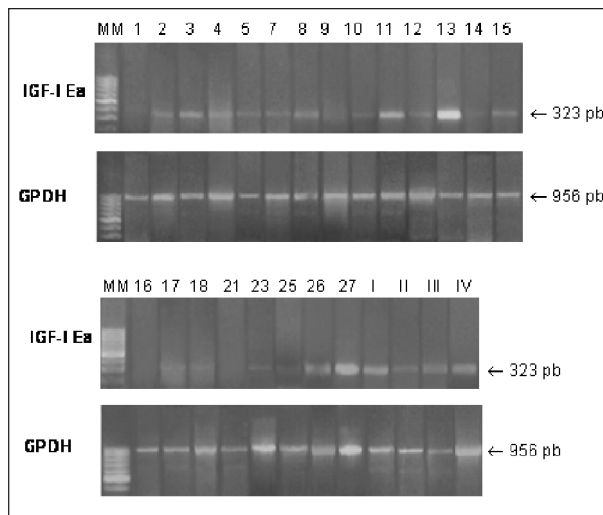


Figura 2. Expresión del ARNm del IGF-I Ea en células LLC y en linfocitos B controles. Las células LLC o linfocitos B controles fueron purificados ($>98\%$) y el ARNm del IGF-I Ea y GPDH fue detectado por análisis de RT-PCR. Líneas de 1-27: pacientes; líneas I-IV: controles representativos de linfocitos B. MM: marcador de peso molecular.

nen su condición de estables. Estos resultados muestran que el grupo con IGF-I elevado tiene una menor sobrevida que los que presentan niveles normales ($P < 0.025$).

Por el contrario, en este grupo de pacientes, la expresión positiva de CD38 (células LLC CD38+ $> 30\%$), marcador de mal pronóstico³³, no correlacionó con una mayor proporción de mortalidad (Fig. 3 C).

En el grupo de pacientes progresivos se reportaron 4 decesos pero no se encontró relación entre el aumento de IGF-I sérico y la supervivencia de los pacientes. En este grupo los 2 pacientes que expresaron CD38 y eran progresivos al diagnóstico, fallecieron.

DISCUSION

Existen fuertes evidencias que correlacionan el incremento de niveles séricos del IGF-I con el aumento del riesgo de contraer cáncer de mama¹⁹ o próstata²⁰. Sin embargo, no hay reportes sobre los niveles circulantes del IGF-I en pacientes con LLC.

Es sabido que el IGF-I media la acción anabólica de la HC en forma endocrina y que es sintetizado principalmente por el hígado. Sin embargo, Yakar y col., reportaron que animales que no podían sintetizar IGF-I hepático crecían normalmente, y que alrededor del 30% del contenido del IGF-I sérico provenía de los tejidos³². Estos hallazgos comprobaron que IGF-I autocrino/paracrino local, independiente de la HC³², es un importante factor regulador del creci-

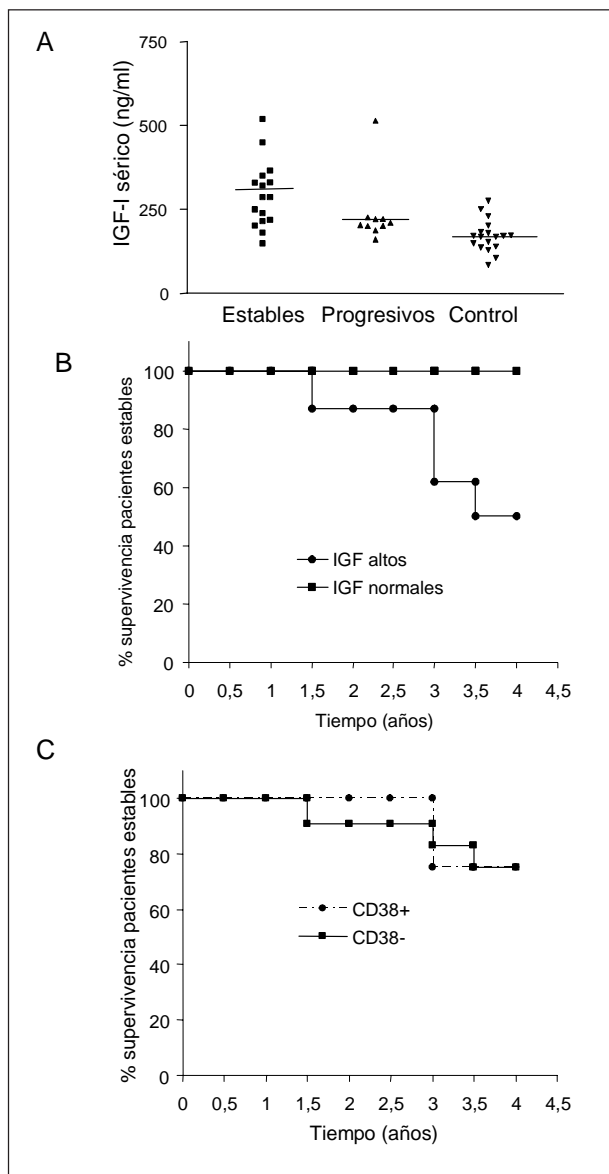


Figura 3. Factores pronósticos en pacientes con LLC diagnosticados como estables. (A) Determinación de IGF-I sérico en pacientes con LLC clasificados en estables y progresivos y en controles. La concentración de IGF-I fue de 294 ± 25 ng/ml en los estables y de 234 ± 32 ng/ml para los progresivos. Las líneas sólidas horizontales indican el promedio. (B) Supervivencia de pacientes estables con IGF-I altos (394 ± 28 ng/ml; n=8) vs pacientes con IGF-I normales (218 ± 15 ng/ml; n= 8), $P < 0.025$. Definimos como pacientes con niveles elevados de IGF-I a aquellos cuyo valor es mayor a la media más tres desvíos estándar del grupo control (>313.7 ng/ml). (C) Supervivencia de pacientes estables con expresión positiva de CD38 en comparación con aquellos con expresión negativa. Diferencia no significativa.

miento, como fue sugerido previamente por Jansen y col³⁴.

En el presente trabajo hemos demostrado un significativo aumento en la concentración sérica del IGF-I en pacientes con LLC con respecto a controles

sanos. Además comprobamos que las células LLC expresan la forma Ea del ARNm del IGF-I y que son capaces de secretar *in vitro* niveles mayores de IGF-I que los linfocitos B controles²². Esto sumado al hecho que recientemente demostramos que el IGF-I es antiapoptótico *in vitro* en células LLC²², sugiere que este factor de crecimiento puede actuar de forma autocrina/paracrina¹¹. El hecho que los niveles de HC fueron normales en estos pacientes, indican que el incremento de niveles séricos de IGF-I es independiente de la HC y que el IGF-I podría provenir de la secreción producida por las propias células LLC. El aumento de la concentración de IGF-I en pacientes con LLC no guardó relación con la estadificación de Binet. Sin embargo, hemos comprobado que dicho incremento en pacientes diagnosticados como estables está ligado a un peor pronóstico, ya que en este subgrupo de pacientes se verificaron decesos o progresión de la enfermedad.

En conclusión, reportamos que las células LLC son capaces de sintetizar IGF-I *in vitro* y que esta producción autocrina/paracrina puede ser la causante del incremento en los niveles séricos de IGF-I de forma independiente de la acción de la HC. Más aun, el aumento de IGF-I en pacientes con LLC estables podría ser utilizado como marcador de mal pronóstico de la enfermedad y por ende ser un indicador adicional para someter a esos pacientes a un tratamiento diferencial.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y técnica, BID 802/OC-AR PICT 0500528, Fundación Alberto Roemmers y CONICET PIP 2000-2263 (RS) y por subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y técnica PICT 13666 y CONICET (DBV).

Los autores quieren agradecer a Rosa Vargas por su soporte técnico. Agradecemos al National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases and Pituitary Program, y al Dr. A. F. Parlow por el anti-suero de IGF-I. Agradecemos a Blackwell Publishing, editores del British Journal of Hematology, por permitirnos la publicación parcial de resultados publicados en 2005, vol 130: pag 58-66.

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the accumulation of long-lived B lymphocytes blocked in $G_{0/1}$ by impaired apoptosis. Because insulin-like growth factor-I (IGF-I) is known for its antiapoptotic effects in different cell types, we investigated whether IGF-I participates in autocrine/paracrine loop in CLL. Serum IGF-I was elevated in CLL patients, but growth hormone was normal.

CLL cells expressed IGF-I mRNA and secreted the growth factor *in vitro*. Therefore, local production of IGF-I can account for the increased levels of serum IGF-I, independently of growth hormone, and may be related to autocrine/paracrine control of lymphocyte survival. Moreover stable patients who had increased levels of serum IGF-I showed a shorter survival in a 4 years follow up. This finding showed that serum IGF-I level in stable patients could be useful as a prognosis marker in CLL.

Key words: Insulin-like growth factor, chronic lymphocytic leukemia, prognosis

BIBLIOGRAFIA

1. Reed JC. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. **Hematol Oncol Clin North Am** 1995; 9: 451-473.
2. O'Brien S, del Giglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood** 1995; 85: 307-318.
3. Binet JL, Auquier A, Dighiero G et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. **Cancer** 1981; 48: 198-206.
4. Rai KR, Sawitsky A. A review of the prognostic role of cytogenetic, phenotypic, morphologic, and immune function characteristics in chronic lymphocytic leukemia. **Blood Cells** 1987; 12: 327-338.
5. Lin K, Sherrington PD, Dennis M et al. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. **Blood** 2002; 100: 1404-1409.
6. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. **Blood** 2003; 101: 4944-4951.
7. Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E. Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol** 2001; 113: 400-406.
8. O'Connor R, Kauffmann-Zeh A, Liu Y et al. Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis. **Mol Cell Biol** 1997; 17: 427-435.
9. Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulinlike growth factors. **Physiol Rev** 1996; 76: 1005-1026.
10. Grimberg A, Cohen P. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. **J Cell Physiol** 2000; 183: 1-9.
11. Lowe WL, Jr., Lasky SR, LeRoith D, Roberts CT, Jr. Distribution and regulation of rat insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids encoding alternative carboxyterminal E-peptides: evidence for differential processing and regulation in liver. **Mol Endocrinol** 1988; 2: 528-535.
12. Landreth KS, Narayanan R, Dorshkind K. Insulin-like growth factor-I regulates pro-B cell differentiation. **Blood** 1992; 80: 1207-1212.
13. Wang LM, Myers MG, Jr., Sun XJ et al. IRS-1: essential for insulin- and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells. **Science** 1993; 261: 1591-1594.
14. Rodriguez-Tarduchy G, Collins MK, Garcia I, Lopez-Rivas A. Insulin-like growth factor-I inhibits apoptosis in IL-3-dependent hemopoietic cells. **J Immunol** 1992; 149: 535-540.
15. Ratajczak MZ, Kuczynski WL, Onodera K et al. A reappraisal of the role of insulin-like growth factor I in the regulation of human hematopoiesis. **J Clin Invest** 1994; 94: 320-327.
16. Kooijman R, Willems M, De Haas CJ et al. Expression of type I insulin-like growth factor receptors on human peripheral blood mononuclear cells. **Endocrinology** 1992; 131: 2244-2250.
17. Baserga R. The IGF-I receptor in cancer research. **Exp Cell Res** 1999; 253: 1-6.
18. Werner H, LeRoith D. The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. **Adv Cancer Res** 1996; 68: 183-223.
19. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA et al. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. **Lancet** 1998; 351: 1393-1396.
20. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. **Science** 1998; 279: 563-566.
21. Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood** 1994; 84: 1361-1392.
22. Schillaci R, Galeano A, Becu-Villalobos D et al. Autocrine/paracrine involvement of insulin-like growth factor-I and its receptor in chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol** 2005; 130: 58-66.
23. Cheson BD, Bennett JM, Grever M et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. **Blood** 1996; 87: 4990-4997.
24. Schillaci R, Ribaudo CM, Rondinone CM, Roldan A. Role of insulin-like growth factor-1 on the kinetics of human lymphocytes stimulation in serum-free culture medium. **Immunol Cell Biol** 1994; 72: 300-305.
25. Quinn KA, Treston AM, Unsworth EJ et al. Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines. **J Biol Chem** 1996; 271: 11477-11483.
26. Swolin D, Brantsing C, Matejka G, Ohlsson C. Cortisol decreases IGF-I mRNA levels in human osteoblast-like cells. **J Endocrinol** 1996; 149: 397-403.
27. Zhou L, Ritchie D, Wang EY et al. Tepoxalin, a novel immunosuppressive agent with a different mechanism of action from cyclosporin A. **J Immunol** 1994; 153: 5026-5037.
28. Brocardo MG, Schillaci R, Galeano A et al. Early effects of insulin-like growth factor-1 in activated human T lymphocytes. **J Leukoc Biol** 2001; 70: 297-305.
29. Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD. Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. **J Endocrinol** 1991; 128: 347-357.
30. Lacau-Mengido IM, Mejia ME, Diaz-Torga GS et al. Endocrine studies in ivomectin-treated heifers from birth to puberty. **J Anim Sci** 2000; 78: 817-824.
31. Zapf J, Walter H, Froesch ER. Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. **J Clin Invest** 1981; 68: 1321-1330.
32. Yakar S, Liu JL, Stannard B et al. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96: 7324-7329.
33. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A et al. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. **Blood** 2001; 98: 2633-2639.
34. Jansen E, Steenbergh PH, LeRoith D, Roberts CT, Jr., Sussenbach JS. Identification of multiple transcription start sites in the human insulin-like growth factor-I gene. **Mol Cell Endocrinol** 1991; 78: 115-125.