

Delección bialélica de 13q14: Un nuevo factor pronóstico en leucemia linfocítica crónica?

Christian Chena¹, Julio Sanchez-Ávalos²,
Guillermo Arrossagaray¹, Raimundo Bezares³,
Karina Turdó⁴, Alicia Bistmans⁵, Irma Slavutsky¹.

Lugares de trabajo:

1. Departamentos de Genética y Clínica Hematológica, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina.
2. Instituto "Alexander Fleming"
3. Servicio de Hematología, Hospital Álvarez
4. Servicio de Hematología, Hospital Aeronáutico
5. Servicio de Hematología, Hospital "Ramos Mejía"

Correspondencia:

Dra. Irma Slavutsky. Departamento de Genética Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex" Academia Nacional de Medicina Pacheco de Melo 3081, 1425 – Buenos Aires, Argentina
TE: 4805-8803/5759 int 241 o 291, FAX: 4803-9475
e-mail: islavutsky@hematologia.anm.edu.ar

F. de ingreso 8/3/07

F. de aprobación 5/6/07



ARTÍCULO
ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 11 N° 1: 21-26
Enero - Abril, 2007

RESUMEN

La pérdida monoalélica de la banda 13q14.3 (13q14x1) es la anomalía más frecuente de la leucemia linfocítica crónica (LLC), asociada a buen pronóstico. La delección bialélica de 13q14.3 (13q14x2) es un evento escasamente evaluado. En este trabajo se analizan las características clínicas, citogenéticas y citomoleculares de 8 pacientes con 13q14x2, de un total de 95 casos (8,4%) (4 mujeres, edad media 64,7 años; rango 47-77 años). Cinco pacientes habían fallecido al momento de este análisis. Se realizó cultivo de sangre periférica con estimulación mitogénica. Se efectuó FISH (Fluorescence in situ hybridization) empleando las sondas: centromérica del cromosoma 12 y locus específica de: D13S319 (13q14), ATM (11q22) y TP53 (17p13). Cinco casos presentaron cariotipo normal y 3 mostraron otras anomalías: +12, i(17)(q10) y cariotipo complejo. Seis casos mostraron concomitantemente 13q14x1 y 13q14x2. El análisis por grupo de riesgo citogenético mostró progresión de la enfermedad en los casos con cariotipo normal y 13q14x2 respecto del 38,7% de los pacientes con 13q14x1 ($p < 0,016$). Nuestro estudio indica que 13q14x2 constituye una alteración originada por evolución clonal, cuya presencia aumentaría la agresividad de la patología, y sugiere a esta anomalía como un posible marcador de enfermedad progresiva de probable valor pronóstico en LLC.

Palabras clave: Leucemia linfocítica crónica, FISH, delección 13q14x2, factor pronóstico

ABSTRACT

Monoallelic deletion of 13q14.3 (13q14x1) is the most common anomaly in chronic lymphocytic leukemia (CLL), associated to a favorable outcome. Biallelic deletion of 13q14.3 (13q14x2) has been scarcely evaluated. Among a total of 95 cases with CLL, we analyze the clinical, cytogenetic and molecular cytogenetic characteristics of 8 (8.4%) patients with 13q14x2 (4 females; mean age: 64.7 years; range: 47-77 years). Five patients have already died at the moment of this study. Chromosome analyses were performed on stimulated peripheral blood lymphocytes. G-banded technique was used. FISH analysis for trisomy 12, and deletions of D13S319 (13q14), ATM (11q22) y TP53 (17p13) were carried out according to standard protocols. Five patients showed normal karyotypes and the remaining three had other alterations: +12 (5.5% of cells), i(17)(q10) and complex karyotype. Six cases showed both clones 13q14x1 and 13q14x2. The distribution by risk FISH categories showed that all the patients with normal karyotypes and 13q14x2 had progressive disease compared to 38.7% of the cases with 13q14x1 alone ($p < 0.016$). Our data indicate that 13q14x2 would represent a more aggressive anomaly than 13q14x1. It would result from clonal evolution and could be considered as a marker of possible prognostic value in CLL.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, FISH, deletion 13q14x2, prognostic factors.

INTRODUCCION

La leucemia linfocítica crónica (LLC) representa el 30% de las leucemias de occidente, siendo la neoplasia a células B maduras más frecuente en adultos. Se caracteriza por presentar un curso clínico altamente variable con un amplio rango de sobrevida, entre unos pocos meses y más de una década a partir del diagnóstico. Alrededor de un tercio de los pacientes tienen escasa sintomatología y una sobrevida similar a la de la población general, un tercio presenta una etapa indolente seguida de progresión y muerte por causas ligadas a la enfermedad, mientras que el tercio restante debuta con enfermedad agresiva y requiere tratamiento inmediato (1).

Si bien las clasificaciones de estadios clínicos establecidas independientemente por Rai et al (2) y Binet et al (3) son de importancia pronóstica, las mismas no resultan suficientes para predecir con certeza el curso clínico en estadios tempranos de la enfermedad, así como tampoco para identificar pacientes con mal pronóstico. Esto determinó la búsqueda de otros parámetros, entre los cuales se encuentran las aberraciones cromosómicas, que constituyen factores de valor pronóstico independiente para progresión de la enfermedad y sobrevida (4).

A diferencia de otras neoplasias hematológicas, la LLC no se encuentra asociada a anomalías cromosómicas específicas. No obstante, la introducción de la técnica de FISH (Fluorescence in situ hybridization)

ha permitido detectar la presencia de diferentes rearrreglos genómicos de valor pronóstico (4). Entre ellos, la deleción hemicigota de 13q14.3 es observada en más de la mitad de los pacientes, y su presencia como anomalía única se encuentra asociada a buena evolución clínica. Por el contrario, los pacientes portadores de deleción 11q22.3 que involucra al gen *ATM* (10-15% de los casos) y de deleción 17p13 que implica la pérdida del gen *TP53* (5-10%), tienen muy corta sobrevida. Los casos con trisomía 12 están asociados a morfología e inmunofenotipo atípicos (5) y correlacionan con un pronóstico intermedio. A diferencia de los rearrreglos genómicos referidos, que han sido exhaustivamente estudiados, el valor pronóstico de la deleción bialélica de 13q14.3 (13q14x2) sola o concomitante con 13q14x1, ha sido muy escasamente evaluada en la literatura (6).

En este trabajo se presentan las características clínicas, citogenéticas y citomoleculares de 8 pacientes con diagnóstico de LLC que muestran deleción bialélica de 13q14.3, tendiente a evaluar su correlación con la evolución clínica de los mismos.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes: De un total de 95 pacientes estudiados entre 1997 y 2005, se detectaron 8 (8,4%) casos que presentaban deleción bialélica de 13q14.3 (4 mujeres; edad media: 64,7 años; rango 47-77 años). En la Tabla 1 se detallan las características clínicas y de tratamiento

Tabla 1: Características clínicas de pacientes con LLC portadores de deleción bialélica de 13q14.

Caso	Edad/sexo	Estadio Clínico ^o	IMO (%)	Hb g/dl	Blancos 10 ⁹ /L (Linfocitosis)	Plaquetas 10 ⁹ /L	LDH	β2M	Tiempo de evolución al momento del estudio citogenético (meses)	Tratamiento	Respuesta	SLT/SV (m)
1	47/F	I	80	9,1	112 (92)	208	276	2,1	6	s/tratamiento		16
2	56/M	I	20	14	35,8 (85)	241	287	1,6	33	CLB ^a F ^a F1+CLF+anti-CD20 ^p	Null PR CR	19 / 52
3	70/F	I	85	13,1	33 (84)	189	410	5,5	10	CLB ^p	PR	18 / 56*
4	70/M	II	40	13,8	62,9 (80)	142	319	7,5	85	CLB ^p	PR	61 / 107*
5	77/F	III	68	10,4	31,4 (66)	138	286	2,5	175	CLB ^a F ^a F1+CLF ^a anti-CD52 ^p MP+anti-CD20 ^p	PR PR CR PR Null?	39 / 186*
6#	58/M	III	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND		1 / 4*
7	64/M	IV	90	7,3	17,6 (98)	25	611	7,8	240	CLB ^a F ^a MP+F1+CLF ^a	PR PR PR	144 / 268
8	76/F	IV	70	10,5	16,6 (89)	10	454	3,6	213	CLB ^a F1+CLF ^a	PR CR	6 / 226*

IMO: infiltración de médula ósea; Hb: hemoglobina; LDH: lactodeshidrogenasa; β2M: Beta 2 microglobulina; SLT: Sobrevida libre de tratamiento; SV: sobrevida; ND: no disponible; °: estadio al momento del estudio citogenético; #: paciente perdido; *: pacientes fallecidos; a: anterior al estudio citogenético; p: posterior al estudio citogenético; m: meses; F: femenino; M: masculino; CLB: clorambucilo; F1: fludarabina; CLF: ciclofosfamida; MP: metilprednisona; PR: respuesta parcial; CR: respuesta completa

to de los pacientes estudiados.

El diagnóstico de LLC se basó en los criterios establecidos en el NCI-WG (National Cancer Institute Working Group) (7). Los estadios clínicos al momento del estudio citogenético fueron determinados acorde a la clasificación de Rai (2). El análisis del inmunofenotipo mostró en todos los casos expresión de los antígenos pan-B (CD19, CD20, CD22) con co-expresión de CD5 y CD23. Cinco pacientes mostraron expresión de cadena liviana kappa y tres de cadena liviana lambda. Todos los pacientes reunieron 5 puntos de la clasificación propuesta por Matutes et al (5). El caso 1 rehusó ser tratada y el caso 6 fue remitido a nuestra Institución sólo para su diagnóstico. El caso 5 presentó evolución a síndrome de Richter. La media de seguimiento desde el diagnóstico fue de 113 meses (rango 4-268 meses). Al momento del presente análisis, cinco pacientes habían fallecido.

En cada caso se estableció la presencia de enfermedad estable o progresiva, acorde a los criterios de Cheson et al (7). Enfermedad estable fue definida como algún estadio Rai sin evidencias de progresión por al menos 6 meses, en tanto que se consideró enfermedad progresiva como algún estadio Rai y parámetros clínicos de progresión que requirieran tratamiento. Como en estudios anteriores (4, 8), los pacientes no fueron seleccionados en cuanto a regímenes de tratamiento.

Estudio citogenético: El análisis cromosómico fue realizado en linfocitos de sangre periférica cultivados a 37°C durante 72-96 horas en medio F-10 suplementado con 15% de suero fetal bovino y estimulado con Pokeweed Mitogen, Phytohemaglutinina A and Lipopolysaccharido. Los preparados fueron procesados por métodos convencionales. Se empleó la técnica de bandedo G para la identificación cromosómica. Los cariotipos fueron descritos utilizando la nomenclatura es-

tablecida en el ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) (9).

Análisis citomolecular: El análisis citomolecular fue efectuado en las mismas muestras empleadas para el estudio citogenético, utilizándose el protocolo estándar. Se emplearon las siguientes sondas: α -satélite del cromosoma 12 (CEP 12, VYSIS) y de secuencia única: D13S319 y D13S25 (LSI D13S319 y LSI D13S25, VYSIS) ubicadas en la banda 13q14, ATM (Ataxia telangiectasia mutated) (LSI ATM, VYSIS) localizada en 11q22.3 y p53 (LSI p53, VYSIS) ubicada en 17p13. En todos los casos se analizaron al menos 400 núcleos interfásicos para cada sonda. El valor de corte, considerado como la media +3 desvíos estándar de la población control (10 individuos) fue de 2.8%, 10.2%, 7.6%, 7.7% y 5.1% para trisomía 12 y monosomías de D13S319, D13S25, ATM y p53, respectivamente.

Análisis estadístico: El análisis comparativo de los datos fue efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado y el Test de Fisher.

RESULTADOS

En la Tabla 2 se presentan los resultados citogenéticos y citomoleculares observados en los pacientes con LLC portadores de delección bialélica sola o concomitante con 13q14x1. Los casos 3, 4 y 6 fueron estudiados con las sondas D13S319 y D13S25. Los pacientes 3 y 6 presentaron delección mono y bialélica de ambos loci, en tanto que el caso 4 mostró delección monoalélica de ambas sondas y bialélica solo de D13S25. Los casos 1 a 5 presentaron cariotipos normales. El tiempo medio desde el diagnóstico hasta el estudio citogenético en este grupo fue de 62 meses (rango 6-175 meses). Los tres pacientes restantes mostraron otras alteraciones genéticas: trisomía 12 por FISH en el caso

Table 2: Estudios citogenéticos y citomoleculares en pacientes con LLC y delección bialélica de 13q14.

Caso	Cariotipo	FISH en núcleos interfásicos (%)				
		+12	13q14x1	13q14x2	17p-	11q-
1	46,XX [15]	1.4	28	41	2.7	1.5
2	46,XY [13]	0.8	9.5	58	2.7	2.2
3	46,XX [10]	1.2	33	42	4.3	1.6
4	46,XY [15]	0.5	40	37*	4.3	1.0
5	46,XX [15]	0.7	73	14	1.7	2.0
6	46,XY [15]	5.5	21	66	4.1	1.4
7	45-46,XY,+der(6)t(5;6)(q13;p15), del(7)(q32),-8,-19,t(21;22)(q10;q10), r,+marx2 [cp11]	1.5	29	68	1.0	0.8
8	46,XX,i(17)(q10)[10]/46,XX[10]	1.0	9.3	88	6.0	4.2

* Delección homocigota sólo para D13S25; Negrita: porcentaje del clon anormal.

Tabla 3: Distribución de pacientes con LLC acorde a las categorías de riesgo establecidas por FISH. Correlación con estatus de la enfermedad y estadio clínico Rai.

FISH	No. de Casos	Estatus LLC (%)		Estadio Rai (%)		
		Estable	Progresión	0	I-II	III-IV
Normales	26	19 (73.0)	7 (27.0)	11 (42.3)	10 (38.4)	5 (19.2)
Anormales	74	27 (36.5)	47 (63.5)*	23 (31.1)	32 (43.2)	19 (25.7)
13q14 x 1	31	19 (61.3)	12 (38.7)	14 (45.2)	10 (32.3)	7 (22.6)
13q14 x 2	5	0	5 (100)#	0	4 (80,0)	1 (20,0)
+ 12	24	7 (29)	17 (71)##	8 (33.3)	12 (50.0)	4 (16.7)
ATM	4	1 (25)	3 (75)	1 (25.0)	3 (75.0)	0
TP53	10	0	10 (100)**	0	3 (30.0)	7 (70.0)

* Diferencias significativas respecto de normales: $p < 0,003$.

Diferencias significativas respecto de 13q14x1: $p < 0,016$

Diferencias significativas respecto de 13q14x1: $p < 0,03$

** Diferencias significativas respecto de 13q14x1: $p < 0,001$

6 (5,5% de las células), cariotipo complejo en el caso 7, e i(17)(q10) en el caso 8. El paciente 6 fue estudiado al momento del diagnóstico, en tanto que los casos 7 y 8 durante la progresión de la enfermedad. Los casos 2 y 8 mostraron sólo delección bialélica (58% y 88% de las células, respectivamente). Los restantes 6 pacientes presentaron ambas delecciones 13q14x1/ 13q14x2, en 4 de ellos el clon con delección bialélica mostró mayor porcentaje.

Simultáneamente, se distribuyeron los pacientes acorde a las categorías de riesgo ya establecidas por FISH (4) y se correlacionaron con la presencia de enfermedad estable o progresiva (Tabla 3). Esto permitió observar que los pacientes con anomalías genómicas tenían mayor probabilidad de progresar respecto de los que no presentaban alteraciones ($p < 0,003$). Cuando se analizaron las anomalías en forma específica, se observó que el total de casos con 13q14x2 presentaba progresión respecto del 38,7% de los pacientes con 13q14x1 ($p < 0,016$). Asimismo, y confirmando datos previos de la literatura, encontramos altos porcentajes de progresión en los pacientes con +12, del(17p) y del(11q) con diferencias significativas respecto de 13q14x1 en los dos primeros grupos ($p < 0,03$ y $0,001$, respectivamente).

DISCUSIÓN

En este trabajo se presentan las características clínicas, citogenéticas y citomoleculares de ocho pacientes con delección 13q14x2 sola o concomitante con 13q14x1. Si bien esta alteración es conocida en los laboratorios que efectúan estudios citomoleculares, son pocos los trabajos que hacen referencia específica a la misma (4, 6, 8, 10-12), y sólo un estudio (6) sugiere

un comportamiento clínico más agresivo en estos pacientes.

Nuestra población de pacientes con LLC mostró un 8,4% de casos con delección bialélica de 13q14, valor que se encuentra dentro de lo observado en la bibliografía, que presenta un rango de 4,5-20% de pacientes con esta alteración (4, 6, 8, 10-12). El 75% de nuestros casos mostraron ambas delecciones, hallazgo que sugiere la presencia de evolución clonal, observándose en el 67% una mayor proporción de células correspondiente al clon con delección bialélica. La correlación con los datos clínicos nos muestra que los cinco pacientes con cariotipo normal y 13q14x2 presentaron progresión de la enfermedad, lo que indica un comportamiento significativamente diferente al observado en los casos con delección monoalélica del(13q14x2), asociados a buen pronóstico. Resulta interesante destacar que los pacientes 7 y 8 presentaron enfermedad estable durante largo tiempo y que la del 13q14x2 se observa en el momento en que la patología comienza a progresar, encontrándose acompañada por otras alteraciones cromosómicas.

La pérdida de la banda 13q14.3 es considerada un evento primario en el desarrollo de la LLC, siendo observada en muchos casos como única anomalía, situación que le confiere significado patogénico. Asimismo, esta alteración ha sido también descrita en otras neoplasias hematológicas (50% de los linfomas del manto, 20% de los mielomas múltiples) así como en numerosos tumores sólidos (13-15), sugiriendo la presencia de uno o más genes supresores de tumor en esta región. No obstante, si bien fueron muchos los genes evaluados, no fue factible demostrar la participación de ninguno de ellos en el desarrollo de la LLC (13-15).

Estudios más recientes demostraron la presencia en 13q14.3, de los genes *miR-15a* y *miR-16-1* (16), pertenecientes a una familia que codifica para pequeñas moléculas de ARN (19 a 25 nucleótidos de longitud), denominados micro-RNAs (miRNAs), que actúan como reguladores negativos de la expresión génica (17, 18). Los mismos se encuentran frecuentemente sub-expresados en pacientes con LLC (16), situación que lleva a considerarlos actualmente como los genes blanco de la delección. Asimismo, diferentes estudios detectaron que, aproximadamente el 50% de los microRNAs humanos conocidos, se encuentran localizados en regiones del genoma asociadas a neoplasias, lo que sustentaría su participación en el proceso de carcinogénesis (19-23). Resulta interesante destacar que estos miRNAs presentan un cluster muy similar en 3q25-q26.1 donde se localizan los genes *miR-15b* y *miR-16-2* (24, 25), que presentan muy bajos niveles de expresión en pacientes con LLC (19).

Desde el punto de vista funcional, *miR-15a* y *miR-16-1* actúan como reguladores negativos del gen anti-apoptótico *BCL-2* (26), de manera tal que la sobre-expresión de *BCL-2* causada por la disminución de la expresión de estos micro-RNAs parecería ser el principal mecanismo regulatorio involucrado en la patogénesis de los pacientes con LLC portadores de delección 13q14. Esta situación permitiría considerar a estos micro-RNAs como posibles blancos terapéuticos para bloquear el mecanismo oncogénico de *BCL-2* en la LLC. Estos hallazgos permiten considerar a la LLC como una enfermedad genética en la que las principales alteraciones ocurren a nivel de la regulación transcripcional o postranscripcional del genoma de las células neoplásicas debido a la desregulación de estos microRNAs.

Por otra parte, si bien durante mucho tiempo se consideró que la LLC era una patología genéticamente estable, en la última década fue factible comprobar la presencia de evolución clonal en aproximadamente el 10-20% de los pacientes (12, 27, 28), mecanismo asociado a progresión de la enfermedad (12, 29). Los estudios de Dewald et al (6) en pacientes con 13q14x2 como única anomalía, empleando diferentes sondas que mapean a nivel de 13q14, permitieron detectar diferentes delecciones en el alelo paterno y materno, sustentando la presencia de eventos independientes, indicativo de evolución clonal. Esto lleva a los autores a sugerir por primera vez que 13q14x2 representaría una anomalía más agresiva que 13q14x1. Nuestros resultados sustentan esta hipótesis, ya que el 75% de nuestros pacientes mostró concomitancia de 13q14x1 y 13q14x2, indicativo de evolución clonal, y el total de casos presentó progresión de la enfermedad.

En conclusión, el presente análisis indica que 13q14x2 constituye una alteración originada por evo-

lución clonal, cuya presencia aumentaría la agresividad de la patología, y sugiere a esta alteración como un posible marcador de enfermedad progresiva de probable valor pronóstico en LLC.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue efectuado con subsidios provistos por el CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

BIBLIOGRAFÍA

- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2005; 352: 804-815.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Paternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-223.
- Binet J, 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.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2000; 343: 1910-1916.
- Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; 8: 1640-1645.
- Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 121: 287-295.
- 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.
- Aoun P, Blair HE, Smith LM, et al. Fluorescence in situ hybridization detection of cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 1595-1603.
- ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F, ed. Karger, Basel, 1995.
- Reddy KS. Chronic lymphocytic leukemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridization panel. *Br J Haematol* 2006; 132: 705-722.
- Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kem W, Schoch C. Immunomodulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 patients with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 2006; 108: 3152-3160.
- Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4634-4641.
- Corcoran MM, Rasool O, Liu Y, et al. Detailed molecular delineation of 13q14.3 loss in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1998; 91:1382-1390.
- Corcoran MM, Hammarsund M, Zhu C, et al. DLEU2 encodes an antisense RNA for the putative bicistronic RFP2/LEU5 gene in humans and mouse. *Genes Chrom Cancer*. 2004; 40:285-297.
- Migliazza A, Bosh F, Komatsu H, et al. Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 97: 2098-2104.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletion

- and down-regulation of micro-RNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci** 2002; 99: 15524-15529.
17. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science** 2001; 294: 853-858.
 18. Storz G. An expanding universe of noncoding RNAs. **Science** 2002; 296: 1260-1263.
 19. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2004; 101: 11755-11760.
 20. Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. **Mol Cancer Res** 2003; 1: 882-891.
 21. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. **Cancer Res** 2004; 64: 3753-3756.
 22. Metzler M, Wilda M, Bush K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. **Genes Chrom Cancer** 2004; 39: 167-169.
 23. Lu J, Gertz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature** 2005; 435: 834-838.
 24. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. **Curr Biol** 2002; 12: 735-739.
 25. Chen CZ, Lodish HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. **Semin Immunol** 2005; 17: 155-165.
 26. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc Natl Acad Sci** 2005; 102: 13944-13949.
 27. Oscier D, Fitchett M, Herbert T, Lambert R. Karyotypic evolution in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Genes Chrom Cancer** 1991; 3: 16-20.
 28. Chena C, Arrossagaray G, Scolnik M, Palacios MF, Slavutsky I. Interphase cytogenetic analysis in Argentinean B-cell chronic lymphocytic leukemia patients: association of trisomy 12 and 13q14 deletions. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 146: 154-160.
 29. Chena C, Arrossagaray G, Slavutsky I. Evolución cromosómica clonal en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC). **Medicina** 64 (Supl II): 87, 2004.