

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**ESTUDIO DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS  
GENÉTICOS DE LA LEUCEMIA LINFÁTICA  
CRÓNICA E IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS  
MARCADORES MOLECULARES CON  
RELEVANCIA CLÍNICA**

**JOSÉ ÁNGEL HERNÁNDEZ RIVAS**

**Salamanca, 2008**

# ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	<b>3</b>
1.1 Generalidades.....	4
1.2 Clasificación de los síndromes linfoproliferativos.....	5
1.3 Leucemia linfática crónica (LLC).....	6
1.3.1 Epidemiología.....	8
1.3.2 Etiología.....	9
1.3.3 Histopatología.....	9
1.3.4 Inmunofenotipo.....	10
1.3.5 Presentación clínica.....	12
1.3.6 Laboratorio y diagnóstico por la imagen.....	13
1.3.7 Criterios diagnósticos.....	14
1.3.8 Diagnóstico diferencial.....	15
1.3.9 Complicaciones de la LLC.....	16
1.3.10 Tratamiento.....	17
1.3.11 Factores pronósticos.....	21
1.4 Las nuevas herramientas diagnósticas en la LLC.....	33
<b>2. Hipótesis</b> .....	<b>36</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>39</b>
<b>4. Pacientes y métodos</b> .....	<b>41</b>
4.1 Pacientes.....	42
4.1.1. Estudio de la serie global .....	42

4.1.2. Estudio de la serie de pacientes con alteraciones en 14q32.....	45
4.1.3. Estudio de la serie de pacientes con delección en 13q.....	45
4.1.4. Estudio de la relación de la proteína Vav y la LLC.....	46
4.2. Métodos.....	46
4.2.1. Hibridación “in situ” fluorescente (FISH).....	47
4.2.2. Patrón mutacional de los genes IgV <sub>H</sub> .....	50
4.2.3. Análisis estadístico (FISH y mutaciones somáticas).....	58
4.2.4. Estudio mediante microarrays de oligonucleótidos.....	59
4.2.5. Caracterización de la proteína Vav.....	68
<b>5. Resultados y Discusión.....</b>	<b>70</b>
<b>5.1. El análisis de los factores pronósticos define nuevos grupos pronósticos en la LLC-B.....</b>	<b>71</b>
5.1.1. Resultados.....	71
5.1.2. Discusión.....	88
<b>5.2. Los pacientes con LLC-B y alteraciones en 14q32/<i>IGH</i> presentan un curso clínico desfavorable.....</b>	<b>98</b>
5.2.1. Resultados.....	98
5.2.2. Discusión.....	104
<b>5.3. Los pacientes con LLC con un número alto de pérdidas en 13q presentan un curso clínico peor y características biológicas específicas.....</b>	<b>109</b>
5.3.1. Resultados.....	109
5.3.2. Discusión.....	121

<b>5.4. La sobreexpresión del producto del proto-oncogén VAV</b>	
<b>se asocia con las LLC con 13q-.....</b>	<b>127</b>
<b>5.4.1. Resultados.....</b>	<b>127</b>
<b>5.4.2. Discusión.....</b>	<b>129</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>132</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>135</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>157</b>

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AHAI</b>	Anemia hemolítica autoinmune
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>ARN/RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BAC</b>	<i>Bacterial artificial clone</i>
<b>°C</b>	Grado centígrado
<b>CGH</b>	Hibridación genómica comparada
<b>CDR</b>	Regiones que determinan complementariedad
<b>Del</b>	delección/pérdida
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>dl</b>	decilitro
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetracético
<b>FAB</b>	Clasificación Franco-Alemana-Británica
<b>FISH</b>	Hibridación “in situ” fluorescente
<b>FDR</b>	<i>False discovery rate</i>
<b>g</b>	gramo
<b>g</b>	revoluciones por minuto
<b>GCOs</b>	<i>GeneChip Operating Software</i>
<b>GDP</b>	Guanosin difosfato
<b>GTPasa</b>	Guanosina trifosfatasa
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IgV<sub>H</sub></b>	Región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas
<b>IPA</b>	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
<b>INC/NCI</b>	Instituto Nacional del Cáncer
<b>LDH</b>	Lactodeshidrogenasa
<b>LLA</b>	Leucemia Linfoide Aguda
<b>LLC</b>	Leucemia Linfática Crónica
<b>LNH</b>	Linfoma no hodgkiniano
<b>M</b>	Molar
<b>MAP</b>	Proteína activada por mitógenos

<b>MAS</b>	<i>Microarrays Analysis Suite</i>
<b>mg</b>	miligramo
<b>miRNA</b>	MicroRNA
<b>ml</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mM</b>	milimolar
<b>MO</b>	Médula ósea
<b>µg</b>	microgramo
<b>µl</b>	microlitro
<b>µm</b>	micrómetro
<b>NCB</b>	Neoplasias maduras de células B
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de polimerasa
<b>PEG</b>	Perfiles de expresión génica
<b>PLG</b>	<i>Phase Lock Gels</i>
<b>pmol</b>	picomol
<b>PSM</b>	proteasoma
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>REAL</b>	<i>Revised European American Lymphoid Classification</i>
<b>RMA</b>	<i>Robust Multichip Average</i>
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de polimerasa - transcriptasa inversa
<b>SAM</b>	<i>Significant analysis of microarrays</i>
<b>SF</b>	<i>Scaling Factor</i>
<b>SG</b>	Supervivencia global
<b>SLE</b>	Supervivencia libre de enfermedad
<b>SLP</b>	Síndrome linfoproliferativo
<b>SMD</b>	Síndrome mielodisplásico
<b>SMP</b>	Síndrome mieloproliferativo
<b>TC</b>	Tomografía computerizada
<b>TCR</b>	Receptor de célula T
<b>TPT</b>	Tiempo hasta primer tratamiento
<b>WILLC</b>	<i>Workshop</i> Internacional de Leucemia Linfática Crónica

# **1. Introducción**

## 1.1 Generalidades

La leucemia linfática crónica (LLC) es una hemopatía maligna con una heterogeneidad clínica importante<sup>1-5</sup>, debida, en gran medida, a las alteraciones genéticas que presentan las células leucémicas en cada paciente<sup>6,7</sup>. Los sistemas de estadificación clínica constituyen los índices más utilizados en la práctica para establecer el pronóstico<sup>8,9</sup>. Sin embargo, no pueden predecir el curso individual de los pacientes en estadios iniciales. En los últimos años se han producido avances en el conocimiento de la patogenia y de las alteraciones moleculares de la LLC, que han proporcionado nuevos factores pronósticos bioquímicos ( $\beta_2$ microglobulina, timidina kinasa sérica, niveles de IL-6 e IL-10...)<sup>10,11</sup>, antigénicos (expresión de los antígenos CD38, CD49d, ZAP-70)<sup>12-14</sup> y citogenético-moleculares<sup>15,16</sup>. Entre éstos, cabe destacar las alteraciones citogenéticas estudiadas mediante hibridación in situ (FISH)<sup>17-19</sup>, que identifican grupos con pronóstico favorable: pérdida de 13q (13q-) y desfavorable: pérdida de 11q (11q-) o pérdida de 17p (17p-), así como el estudio de las mutaciones somáticas en la región variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgV<sub>H</sub>), que han puesto de manifiesto que los pacientes con mutaciones somáticas presentan características clínicas, citogenéticas y pronósticas favorables<sup>20,21</sup>. Aún así, la importancia clínica de estas alteraciones presenta controversias, ya que un 10% de los enfermos con 11q- y 17p- presentan patrón mutado mientras que hasta un 50% de los pacientes con 13q- no lo tiene. Además, quedan por definir aspectos pronósticos de las LLC con algunas alteraciones menos frecuentes, como las que afectan a la región 14q32, donde se sitúa el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas<sup>22</sup>.

En los últimos años, la secuenciación del genoma humano y los avances en la informática y robótica han producido una revolución en la Genética<sup>23</sup>. La conjunción de

estas tres metodologías ha desarrollado la tecnología de “microarrays”, que permite analizar simultáneamente miles de genes. Dentro de los estudios de biochips se incluyen los microarrays de expresión<sup>24</sup> y los arrays genómicos o CGH-arrays<sup>25,26</sup>. En la LLC se han comenzado a obtener resultados, aún preliminares, que indican que los genes significativamente más diferenciados se localizan en las regiones donde existen las aberraciones cromosómicas. Sin embargo, los datos que relacionan las alteraciones genéticas determinadas mediante FISH o el estado mutacional con los resultados de arrays no son aún muy consistentes.

## **1.2 Clasificación de la OMS de los síndromes linfoproliferativos**

En el año 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la Clasificación de los Tumores de los Tejidos Hematopoyéticos y Linfoides<sup>27</sup>. En su metodología se incorporan las características clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas, citogenéticas y moleculares de manera complementaria. En el capítulo 6 de este libro se incluyen las neoplasias maduras de células B (NCB), que constituyen proliferaciones clonales de linfocitos B en diferentes estadios de su diferenciación, desde las células *naïve* B a las células plasmáticas maduras (Tabla 1)<sup>27</sup>. Globalmente, las NCB suponen más del 90% de los cánceres linfoides y representan en torno al 5% del total de las neoplasias. Constituyen, sin duda, el grupo más numeroso de cánceres hematológicos, con una incidencia creciente a lo largo de las tres últimas décadas. En la actualidad, las NCB son la quinta causa más prevalente de cáncer en los países occidentales y la sexta en cuanto a la mortalidad de la patología neoplásica<sup>28,29</sup>.

**Tabla 1. Neoplasias de células B maduras (Clasificación de la OMS, 2001)**

Leucemia linfática crónica/Linfoma linfocítico de célula pequeña 9823/3
Leucemia prolinfocítica de célula B 9670/3
Linfoma linfoplasmocítico 9671/3
Linfoma esplénico de la zona marginal 9689/3
Leucemia de células peludas 9940/3
Mieloma múltiple 9732/3
Gammapatía monoclonal de significado incierto 9765/1
Plasmocitoma óseo solitario 9731/3
Plasmocitoma extraóseo 9734/3
Amiloidosis primaria 9769/1
Enfermedades de las cadenas pesadas 9762/3
Linfoma ganglionar de células B de la zona marginal del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) 9699/3
Linfoma ganglionar de células B de la zona marginal 9699/3
Linfoma folicular 9690/3
Linfoma B difuso de célula grande 9680/3
Linfoma B mediastínico de célula grande 9679/3
Linfoma B intravascular de célula grande 9680/3
Linfoma primario de cavidades 9678/3
Linfoma/leucemia de Burkitt 9687/3, 9826/3

### 1.3 Leucemia linfática crónica (LLC)

Las leucemias se describieron por primera vez por Virchow en 1847 (una de las formas descritas de la enfermedad probablemente se trataba de una LLC). La LLC se definió como una entidad diferente a principios del siglo XX por Türk, que demostró la similitud entre la LLC y algunos linfomas, aunque fueron Minow e Isaacs, en 1924, los que realizaron una de las primeras descripciones de la historia natural de la LLC y discutieron el papel del tratamiento con irradiación de esta enfermedad. La introducción del tratamiento con clorambucilo, hace más de 50 años, supuso una revolución en el tratamiento de la LLC; de hecho, este tratamiento aún se utiliza con frecuencia, sobre todo en pacientes de edad avanzada, con resultados muy aceptables<sup>30</sup>.

La Clasificación de la OMS define la leucemia linfática crónica (LLC) como una neoplasia de linfocitos B monomorfos, pequeños y redondeados presentes en la sangre periférica, médula ósea y ganglios linfáticos<sup>27</sup>. En 1997, se consensuó la separación de

la LLC-B de la leucemia prolinfocítica-B, la cual se incluía en la entidad LLC-B/Linfoma linfocítico de célula pequeña en la clasificación REAL (*Revised European American Lymphoma Classification*). Los linfocitos de la LLC-B, entremezclados con prolinfocitos y paraimunoblastos (seudofolículos), además de los antígenos (Ags) pan-B, CD19 y CD20, éste último con positividad débil, expresan de modo característico los Ags CD5 y CD23, así como una pequeña cantidad de inmunoglobulinas (Igs) de superficie y CD79b.

Hasta hace unos años se consideraba a la LLC como una enfermedad clínicamente heterogénea con un origen celular homogéneo. Sin embargo, hoy se sabe que la LLC se origina a partir de linfocitos B que pueden diferir en la activación, en el estado de maduración o en el subgrupo celular<sup>2,7</sup>. De hecho, inicialmente se consideró que se originaba a partir de células B *naive* o del centro pregerminal, aunque en la mitad de los casos como mínimo, la célula original es un linfocito B de memoria que pasa a través del centro germinal. Es probable que inicialmente no exista un defecto apoptótico y que la acumulación de las células leucémicas se deba a la generación de señales de supervivencia producidas por el medio ambiente externo a través de diversos receptores (receptores de la célula B, receptores de citocinas...)<sup>31-34</sup>. Aún así, la LLC es una enfermedad acumulativa con un nivel de proliferación más alto de lo que previamente se había postulado<sup>3,35-37</sup>.

La LLC presenta un curso clínico muy variable: tradicionalmente, se ha considerado que alrededor de una tercera parte de los pacientes no requerirán nunca tratamiento, tendrán una supervivencia prolongada y fallecerán por causas no relacionadas con la enfermedad. En otro tercio de los casos, tras una fase indolente se produce la progresión de la enfermedad. Por último, en la tercera parte de pacientes restante, desde el diagnóstico se descubre la agresividad del cuadro clínico que obliga a la instauración de

un tratamiento precoz<sup>38</sup>. Sin embargo, con la realización rutinaria de hemogramas en la población general, el número de pacientes asintomáticos es cada vez mayor y, por el contrario, los que de entrada requieren tratamiento es inferior al 15%<sup>39</sup>.

Como se ha referido, el tratamiento, hasta bien entrada la década de los años 80, se basó en el uso del clorambucilo, utilizado solo o en combinación con esteroides, y en agentes alquilantes. A partir de dicha fecha se comenzaron a utilizar los análogos de las purinas (principalmente la fludarabina)<sup>40</sup> con los que se consiguió mejorar la supervivencia libre de enfermedad. La combinación de los mismos con otros fármacos (ciclofosfamida, rituximab...) <sup>41-43</sup> puede aumentar la supervivencia global, aunque aún se necesita de más seguimiento de los estudios para confirmar este hecho<sup>44</sup>. Algunos fármacos, como el alemtuzumab<sup>45,46</sup>, pueden utilizarse como tratamiento de rescate, con efectividad en algunos pacientes, aunque a costa de una toxicidad no desdeñable. Por último, las diversas modalidades del trasplante de precursores hematopoyéticos, fundamentalmente los trasplantes de intensidad reducida, han proporcionado resultados esperanzadores en los últimos años<sup>47-50</sup>.

### 1.3.1 Epidemiología

La LLC es la leucemia más frecuente en Occidente, ya que supone alrededor del 25% del conjunto de las mismas; sin embargo, en Asia representa menos del 5% de todas las leucemias. La incidencia ajustada por edad se sitúa en 3 casos por 100.000 personas y es más frecuente en el sexo masculino con una razón varón/mujer de 1,5-2:1<sup>38</sup>. La mediana de edad en el momento del diagnóstico se sitúa entre los 65 y 70 años. Aún así, un grupo significativo de pacientes se diagnostican en edades más tempranas, aunque su aparición antes de los 30 años es excepcional.

### 1.3.2 Etiología

Es desconocida y, al contrario de lo que sucede con otras leucemias, no se asocia a la exposición a radiaciones ionizantes, fármacos, tóxicos o virus. El riesgo de LLC y otros cánceres se halla elevado entre los familiares de pacientes diagnosticados de esta hemopatía<sup>51-55</sup> y, es posible, que se produzca un fenómeno de anticipación en algunos casos de LLC familiar<sup>56</sup>.

### 1.3.3 Histopatología

En la LLC-B podemos observar característicamente tres tipos de células: a) linfocitos pequeños, los cuales miden alrededor de 5-6  $\mu\text{m}$ , tienen un núcleo redondeado con cromatina agrupada y citoplasma escaso. En ocasiones, el núcleo presenta una hendidura, recordando la célula a un centrocito, lo que morfológicamente puede plantear el diagnóstico diferencial con un linfoma folicular o, incluso, con un linfoma de células del manto con expresión hemoperiférica; b) prolinfocitos, que tienen un diámetro de 10  $\mu\text{m}$ , con un núcleo redondeado y cromatina dispersa con un nucléolo evidente y mayor cantidad de citoplasma. Si la cifra de los prolinfocitos en sangre periférica se sitúa entre el 11-55% del total linfocitario se habla de LLC en transformación prolinfocítica. Una cifra mayor es diagnóstica de leucemia prolinfocítica B, entidad que, como se ha referido previamente, no se incluye en la LLC-B en la nueva clasificación de la OMS; c) parainmunoblastos: células mucho más grandes (diámetro de 20  $\mu\text{m}$ ) y escasas en cuanto al número. En ocasiones, la LLC-B puede presentar una diferenciación plasmocitoide, que plantea su diagnóstico diferencial con los linfomas linfoplasmocitoides, o exhibir células de hábito sternbergoide<sup>27,57</sup>.

En la médula ósea (MO) se observa acumulación e infiltración de los linfocitos, produciendo un patrón de crecimiento intersticial, nodular o difuso. En éste último se

produce una sustitución de las otras series hematopoyéticas por linfocitos que invaden toda la MO. La presencia de un patrón medular difuso podría constituir un factor pronóstico desfavorable independiente<sup>58</sup>, aunque este hecho no se ha confirmado por otros autores<sup>59,60</sup>. A nivel ganglionar la LLC muestra tres patrones de crecimiento diferentes: difuso, parainmunoblástico y pseudo-folicular (también llamado centro de proliferación o centros de crecimiento). Éste último es el que más frecuentemente se observa en los ganglios linfáticos de los pacientes afectados de LLC-B.

#### 1.3.4 Inmunofenotipo

En la mayoría de los casos, el diagnóstico de la LLC se basa en un cuadro clínico compatible (linfocitosis periférica con o sin adenopatías) y en la demostración del origen clonal de dichos linfocitos de la sangre periférica mediante el estudio inmunofenotípico realizado por citometría de flujo<sup>61</sup>. Característicamente, los elementos celulares de la LLC expresan los Ags CD5 y CD23. Este perfil fenotípico es diferente de los LNH-B con expresión periférica, ya que únicamente algunos linfomas de células del manto y esplénicos de la zona marginal pueden expresar estos antígenos. Las inmunoglobulinas de superficie (kappa o lambda) son débilmente positivas y los marcadores CD22/CD79b pueden ser negativos o de positividad débil.

Los linfocitos pequeños y maduros expresan poca cantidad de CD20 (al contrario de lo que sucede en los prolinfocitos), lo que puede explicar la relativa poca sensibilidad de los enfermos con LLC al tratamiento “in vivo” con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab), sobre todo si se administra como único tratamiento<sup>62</sup>. Las células de la LLC son CD10 y Bcl-6 negativas, aunque expresan un marcador de célula B de memoria, el CD27. Los Ags CD19 y CD43 son positivos, mientras que la ciclina D1 es negativa. La

positividad de FMC7, presente en un 15-20% de los casos, añade un pronóstico peyorativo en algunas series<sup>63</sup>.

La expresión de CD38 es un factor independiente de mal pronóstico, aunque la intensidad del mismo puede variar en el curso de la enfermedad<sup>64,65</sup>. Por otra parte, la expresión de la proteína ZAP-70, una tirosincinasa que participa en las vías de señalización celular y se comporta como un factor de transcripción, puede utilizarse como un importante factor pronóstico de la LLC y como el mejor marcador indirecto del estado mutacional de los genes  $IgV_H$ <sup>13</sup>. Recientemente, se ha reconocido como factor de mal pronóstico la expresión de CD49d<sup>66</sup>.

Las células neoplásicas generalmente expresan Bcl-2, cuya síntesis no se relaciona con la presencia de la t(14;18), y probablemente traduce la protección natural contra la apoptosis que se produce en la LLC. En el ganglio linfático de la LLC el índice proliferativo (Ki-67) es bajo.

Matutes *et al*, establecieron un sistema de puntuación basado en el uso de 5/6 variables para el diagnóstico de la LLC (Tabla 2)<sup>67</sup>. La mayoría de los pacientes presentan una puntuación de 4 ó 5, aunque algún caso puede tener 3 puntos. Los pacientes con 0-2 puntos no pueden diagnosticarse de LLC sino de otros síndromes linfoproliferativos. Recientemente, se han propuesto otros sistemas, aunque se hallan menos generalizados en la práctica clínica<sup>68</sup>.

**Tabla 2. Sistema de puntuación según Matutes *et al*, basado en marcadores inmunofenotípicos<sup>67</sup>**

	1	0
<b>CD5</b>	Positivo	Negativo
<b>CD23</b>	Positivo	Negativo
<b>FMC7</b>	Negativo	Positivo
<b>IgS</b>	Débil	Moderado/Fuerte
<b>CD22/CD79b</b>	Débil/Negativo	Moderado/Fuerte

### 1.3.5 Presentación clínica

La mayoría de los pacientes se hallan asintomáticos en el momento del diagnóstico y en más de la mitad de los casos éste se realiza a partir de un análisis de rutina, de un preoperatorio o en el contexto de la evaluación de alguna otra enfermedad. En otras ocasiones, la aparición de adenopatías cervicales, axilares o inguinales o de molestias en el hipocondrio izquierdo, secundarias a la esplenomegalia, puede ser el motivo de presentación. En un 5% de los casos la cifra de hemoglobina es  $< 11$  g/dL y/o la de las plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$ . Únicamente el 2-3% de los casos presentan al diagnóstico sintomatología constitucional (fiebre y/o sudores nocturnos y/o pérdida de peso)<sup>38,69</sup>. El tratamiento debe iniciarse cuando hay datos de progresión de la enfermedad (astenia, síntomas generales, citopenias, crecimiento importante de las organomegalias y una mayor susceptibilidad a presentar infecciones bacterianas, fúngicas y víricas)<sup>70</sup>. Las manifestaciones hemorrágicas son raras, salvo en los casos en los que la LLC se acompaña de trombocitopenia severa, que, en algunas ocasiones, es de etiología inmune. En algunos pacientes se observa positividad de la prueba de la antiglobulina (Coombs) directa, con o sin anemia hemolítica asociada<sup>71</sup>.

La característica más frecuente en la exploración física es la presencia de linfadenopatías, que son más comunes en al área laterocervical aunque pueden desarrollarse en cualquier región ganglionar. En el curso de la enfermedad pueden crecer y, en algunos casos, transformarse en un linfoma difuso de célula grande (síndrome de Richter). En una tercera parte de los casos hay esplenomegalia y en un 15% hepatomegalia<sup>72</sup>. La afectación de otros órganos como el corazón, riñones o pulmón es rara, al igual que la infiltración del sistema nervioso central. En ocasiones, se

han descrito infiltrados extraganglionares, sobre todo en la piel, mama y anejos oculares.

Algunos pacientes presentan ascitis o derrame pleural en el curso clínico de la enfermedad, lo que es un signo de mal pronóstico. Es relativamente común un aumento de la susceptibilidad a presentar infecciones, que, en muchos casos, se halla relacionada con la hipogammaglobulinemia severa que suelen presentar algunos pacientes con LLC.

### **1.3.6 Laboratorio y diagnóstico por la imagen**

La característica más importante para el diagnóstico de una LLC es la existencia de linfocitosis periférica. A pesar de que, por definición, todos los pacientes con LLC tienen afectación de la médula ósea y de la sangre periférica por linfocitos maduros y que el recuento linfocitario es superior a  $5 \times 10^9/L$ , es posible realizar un diagnóstico de LLC si esta cifra es inferior, siempre y cuando la morfología y el inmunofenotipo sean compatibles<sup>73</sup>. Recientemente, se ha demostrado que el porcentaje de sombras nucleares o de Gümprrecht en la extensión de sangre periférica se relaciona de manera directa con una mejor supervivencia y mayor tiempo hasta la progresión<sup>74</sup>. La leucocitosis, con linfocitosis, muy elevada suele ser infrecuente en los estadios iniciales de la LLC. A lo largo de su evolución, un 15-20% de los pacientes presentan positividad en la prueba de la antiglobulina directa, aunque en el momento del diagnóstico la prueba de Coombs no suele ser positiva en más del 5% de los enfermos<sup>71</sup>. La realización de una biopsia de médula ósea no es necesaria para establecer el diagnóstico, aunque, como ya se ha referido, el patrón de infiltración es un factor pronóstico de la evolución de la enfermedad en algunas series<sup>58</sup>. En algunos pacientes puede cuantificarse un pequeño componente monoclonal. Determinados autores han sugerido que la elevación de las cifras de la lacticodeshidrogenasa (LDH) y de la  $\beta_2$ microglobulina puede relacionarse

con una variante más agresiva de la enfermedad. De hecho, los niveles de LDH y  $\beta_2$ microglobulina se encuentran elevados al diagnóstico en algunos pacientes y se consideran factores pronósticos desfavorables en la mayoría de las series<sup>10</sup>. La hipercalcemia se ha asociado con mal pronóstico e, incluso, con progresión de la LLC a síndrome de Richter. Ya se ha comentado la importancia del estudio inmunofenotípico de la sangre periférica. Más adelante se profundiza en la necesidad de realizar estudios citogenéticos y de hibridación in situ fluorescente (FISH), a los que recientemente se ha sumado la determinación del estado mutacional del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgV<sub>H</sub>) mediante biología molecular, todos ellos como datos biológicos con valor pronóstico en la LLC.

Generalmente, la realización de una radiografía de tórax constituye un método adecuado para demostrar el grado de afectación intratorácica al diagnóstico. La práctica de una tomografía computerizada (TC) puede ser de utilidad para precisar la existencia de adenopatías torácicas, abdominales o pélvicas y, en algunas series, su estudio es factor pronóstico<sup>75</sup>.

### 1.3.7 Criterios diagnósticos

Los criterios diagnósticos actuales se basan en las recomendaciones del Grupo de Trabajo de Estudio de la Leucemia Linfática Crónica del Instituto Nacional del Cáncer, publicados en 1996<sup>76</sup>, y en las Conclusiones del *Workshop* Internacional llevado a cabo en 2005<sup>73</sup> (Tabla 3). Recientemente, se ha publicado la actualización de las Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la LLC-B<sup>70</sup> y se ha definido mejor la diferencia entre las linfocitosis B monoclonales y la LLC-B<sup>77</sup>.

Tabla 3. Criterios diagnósticos de la leucemia linfática crónica

	INC <sup>a</sup> -1996 <sup>76</sup>	WILLC <sup>b</sup> -2005 <sup>73</sup>
<b>Linfocitos en sangre periférica (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	> 5	No especificado <sup>c</sup>
<b>Morfología</b>	No especificada	Linfocitos pequeños y maduros sin nucléolos visibles; son características las sombras nucleares
<b>Inmunofenotipo</b>	≥ un marcador de célula B (CD19, CD20 ó CD23) y positividad de CD5 en ausencia de otros marcadores pan-T Expresión monoclonal de cadenas kappa o lambda Inmunoglobulinas de superficie de baja intensidad	≥ un marcador de célula B (CD19, CD20 ó CD23) y positividad de CD5 en ausencia de otros marcadores pan-T Expresión monoclonal de cadenas kappa o lambda Inmunoglobulinas de superficie de baja intensidad
<b>Células atípicas (por ejemplo, prolinfocitos)</b>	< 55% y/o < 15 x 10 <sup>9</sup> /L	< 55% y/o < 15 x 10 <sup>9</sup> /L
<b>Duración de la linfocitosis</b>	No especificada	No especificada, aunque necesita que sea crónica
<b>Linfocitos en médula ósea (%)</b>	≥ 30	No se requiere el estudio de la médula ósea <sup>d</sup>

<sup>a</sup>INC: Instituto Nacional del Cáncer. <sup>b</sup>Workshop Internacional de LLC. <sup>c</sup>Se aceptan valores < 5 x 10<sup>9</sup>/L si la linfocitosis es crónica y presenta las características morfológicas e inmunofenotípicas típicas. <sup>d</sup>A pesar de ello, el patrón de infiltración medular es útil para el pronóstico. La realización del estudio medular puede aclarar la causa de las citopenias asociadas.

### 1.3.8 Diagnóstico diferencial

En la Tabla 4 se resumen las principales entidades con las que debe establecerse el diagnóstico diferencial de la LLC.

Tabla 4. Diagnóstico diferencial de la leucemia linfática crónica (Modificado de Yee KWL y O'Brien S<sup>38</sup>)

1. Linfocitosis de origen no clonal
Esplenectomía
Linfocitosis B policlonal persistente asociada al tabaquismo
Esplenomegalia secundaria a paludismo
Infecciones bacterianas (tuberculosis, sífilis)
Infecciones víricas (citomegalovirus, mononucleosis infecciosa)
Enfermedad del suero
Tirotoxicosis
Enfermedad de Addison
2. Linfocitosis de origen clonal
Linfocitosis B monoclonales
Leucemia prolinfocítica
LNH con expresión hemoperiférica (manto, folicular, marginal, difuso de célula grande)
Tricoleucemia
Macroglobulinemia de Waldenström
Leucemia prolinfocítica T
Leucemia/linfoma de célula T del adulto
Síndrome de Sézary
Linfoma T periférico con expresión hemoperiférica

### 1.3.9 Complicaciones de la LLC

La aparición de complicaciones en la LLC es frecuente durante la evolución de la enfermedad. Pueden aparecer:

1.3.9.1 Citopenias inmunes. La anemia hemolítica autoinmune (AHAI) es la más característica<sup>78,79</sup>. La prevalencia de positividad en la prueba de la antiglobulina directa varía, ya que en los estadios más avanzados es mayor. Aún así, al diagnóstico se sitúa entre el 4-5%<sup>71</sup>. Por su parte, la detección de signos clínicos de AHAI se produce entre el 3-35% de los pacientes y es más frecuente en las LLC en estadio avanzado, en el sexo masculino, a mayor edad del paciente y si la cifra de linfocitos es elevada. La aparición de una AHAI en el curso de la LLC no confiere un impacto negativo en cuanto a la supervivencia. Los corticoides son el tratamiento de primera elección. En los casos de ausencia de respuesta pueden utilizarse inmunoglobulinas intravenosas o ciclosporina A (CsA). En los pacientes refractarios a estas terapias se han utilizado otros citostáticos, como la ciclofosfamida, los anticuerpos monoclonales (como el rituximab o el alemtuzumab) la esplenectomía o la irradiación esplénica. La trombocitopenia inmune tampoco afecta a la supervivencia global de la LLC. Alrededor de una tercera parte de los casos tienen además AHAI (síndrome de Evans). Los pilares del tratamiento son semejantes a los de la AHAI. La eritroblastopenia se produce en el 2-5% de las LLC y tampoco parece afectar al pronóstico. En estos casos se debe iniciar tratamiento con corticoides, los cuales deben sustituirse por CsA si no son efectivos. Por último, algunos pacientes pueden desarrollar problemas autoinmunitarios relacionados con el tratamiento, los más clásicos tras el uso de análogos de las purinas.

1.3.9.2 Infecciones<sup>80</sup>. Son responsables de la mitad de las muertes producidas por la LLC. Los pacientes con hipogammaglobulinemia severa e infecciones de repetición, sobre todo respiratorias, se pueden tratar con inmunoglobulinas intravenosas<sup>81</sup>. En

algunos casos, el uso de factores estimulantes de colonias granulopoyéticas (G-CSF) puede disminuir la duración de la neutropenia asociada al tratamiento. Otras medidas consisten en la profilaxis con cotrimoxazol de los pacientes que reciben análogos de las purinas o alemtuzumab y la monitorización de la antigenemia frente a citomegalovirus (CMV) en los enfermos tratados con alemtuzumab así como, probablemente, el valor de la profilaxis con valganciclovir para evitar la reactivación del CMV.

1.3.9.3 Segundas neoplasias. Hasta un 11% de los pacientes a lo largo de su evolución pueden desarrollar cáncer, lo que supone una incidencia moderadamente superior a la de la población general. El desarrollo de leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos es infrecuente, aunque se ha observado mayor frecuencia en los pacientes a los que se ha realizado trasplantes de precursores hematopoyéticos.

1.3.9.4 Progresión de la LLC. En algunos raros casos, más frecuentemente si tienen leucocitosis  $> 100 \times 10^9/L$ , organomegalias y ascitis o derrame pleural, se puede asistir a la progresión a leucemia prolinfocítica. La evolución a un linfoma de célula grande se denomina síndrome de Richter y confiere un pronóstico infausto, con medianas de supervivencia de 6 meses con los tratamientos tradicionales. La realización de trasplantes alogénicos ha conseguido, en pequeñas series de pacientes, lograr la curación en algunos de ellos<sup>82</sup>.

### 1.3.10 Tratamiento<sup>83,84</sup>

Más de 50 años después del uso del clorambucilo como tratamiento para la LLC, los agentes alquilantes aún desempeñan un cierto papel en la terapia de esta enfermedad, fundamentalmente en los pacientes de edad muy avanzada en los que los análogos de las purinas pueden ocasionar una tasa de efectos adversos, entre otros un mayor porcentaje de evolución a síndrome de Richter, no aceptable. En la práctica clínica habitual, y fuera

del contexto de un ensayo clínico, las recomendaciones para iniciar tratamiento en un paciente con LLC incluyen la presencia de, al menos, uno de los siguientes criterios: sintomatología constitucional (síntomas B), empeoramiento progresivo de la anemia y/o de la trombocitopenia de origen no inmune, esplenomegalia progresiva o  $> 7$  cms por debajo del reborde costal, crecimiento progresivo de las linfadenopatías o la presencia de una de ellas  $> 8-10$  cms y linfocitosis progresiva (definida como el aumento superior al 50% en dos meses o la duplicación linfocitaria en un periodo inferior a 6 meses)<sup>30,44,85</sup>.

La utilización precoz de alquilantes en la LLC en estadios iniciales no ofrece ventajas, en cuanto a la supervivencia, frente a la actitud de esperar y ver, como se puso de manifiesto en un metaanálisis de ensayos clínicos aleatorizados<sup>86</sup>.

El uso de los análogos de las purinas, fundamentalmente de la fludarabina, a finales de la década de los 80, supuso la esperanza de encontrar nuevos tratamientos que tuvieran un impacto en la supervivencia global de los pacientes con LLC. A pesar de que en los ensayos clínicos realizados con fludarabina frente a alquilantes se alcanzó una mejoría en la respuesta global (incluyendo mejores tasas de respuestas completas) y de supervivencia libre de enfermedad (SLE) en los pacientes tratados con fludarabina, no se obtuvieron ventajas en lo referente a la supervivencia global (SG)<sup>40,87,88</sup>. Con la intención de mejorar estos resultados, en los últimos años la filosofía del tratamiento de la LLC se basa en intentar demostrar si el tratamiento combinado de fludarabina con agentes quimioterápicos y, en algunos casos, con anticuerpos monoclonales, puede mejorar no solo las tasas de respuesta y de SLE, sino también la SG. En este sentido, hay diversos ensayos clínicos que han evaluado la adición de ciclofosfamida, epirrubicina y/o mitoxantrone con resultados prometedores, que deben reproducirse por otros grupos<sup>89,90</sup>. Con otros análogos de las purinas, como la cladribina y la pentostatina

la experiencia es más reducida<sup>91</sup>. Por otra parte, diversos grupos están llevando a cabo ensayos clínicos para evaluar el papel del rituximab<sup>42</sup> añadido a la combinación de fludarabina y ciclofosfamida<sup>92</sup> o de pentostatina y ciclofosfamida<sup>93-95</sup>, entre otros esquemas. Aún es pronto para afirmar si estas combinaciones tendrán un impacto en la supervivencia global de los pacientes con LLC. Además, se está analizando la influencia que el rituximab pueda tener como tratamiento de mantenimiento antes de su introducción en la práctica clínica habitual.

El tratamiento con alemtuzumab, aunque se ha utilizado como esquema terapéutico de primera línea en algunos estudios, quizás sólo debiera indicarse como tratamiento de inicio en las LLC con 17p-, que son resistentes a fludarabina, solo o en combinación con ciclofosfamida, rituximab o dosis altas de esteroides<sup>96</sup>. En estos casos, la combinación de fludarabina con alemtuzumab, las dosis altas de esteroides<sup>97</sup>, el flavopiridol<sup>98</sup> o la realización de un trasplante alogénico, en los pacientes más jóvenes, parecen ser mejores modalidades de tratamiento<sup>99</sup>.

Si el mejor tratamiento de primera línea de la LLC permanece por elucidar, aún existe más controversia en cuanto a los tratamientos de rescate<sup>50</sup>. Debido a que la expresión de la proteína Bcl-2 se asocia a resistencia a la quimioterapia y a menor supervivencia en los pacientes con LLC, recientemente se ha publicado que la adición de oblimersen (un oligonucleótido antisentido de *BCL-2*) a la combinación fludarabina-ciclofosfamida incrementa de manera significativa la tasa de respuestas completas y respuestas parciales nodulares en los pacientes con LLC refractaria o en recaída<sup>100</sup>. En este mismo sentido, cabe reseñar que se están utilizando en segunda o posteriores líneas nuevos fármacos, algunos de los cuales han demostrado su utilidad en estudios aleatorizados y/o en nuevas combinaciones. Entre estos fármacos destacan el uso de otros anticuerpos monoclonales (anti-CD23 [lumiliximab], anti-CD20 humanizado [ofatumumab]),

inmunomoduladores (talidomida y lenalidomida), otros análogos de purinas (forodesina) e inhibidores dependientes de cinasas (flavopiridol).

En cuanto al trasplante de precursores hematopoyéticos en la LLC, cabe destacar que, en la actualidad, el trasplante autólogo no parece desempeñar un papel relevante en el tratamiento de esta enfermedad<sup>101</sup>. Es posible que se asocie con mejor supervivencia, aunque en los pacientes con 11q- y 17p- no se ha demostrado beneficio. En la actualidad no se recomienda su realización fuera del contexto de un ensayo clínico y con enfermedad mínima residual negativa<sup>102</sup>. El trasplante alogénico convencional se ha asociado a tasas inaceptables de morbimortalidad (mortalidad relacionada con el procedimiento superior al 50%), debido a toxicidades derivadas del régimen de acondicionamiento, a la presencia de una incidencia alta de enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y a diversas complicaciones infecciosas<sup>103</sup>. Además, como ya se ha referido, es relativamente frecuente descubrir poblaciones monoclonales de células B con un fenotipo semejante al de la LLC, por lo que a los donantes familiares HLA idénticos se les debería realizar previamente un estudio inmunofenotípico de sangre periférica. Los trasplantes de intensidad reducida (TIR) o mini-alotrasplantes han reducido la toxicidad asociada a los trasplantes alogénicos convencionales en lo referente a la mortalidad precoz. Sin embargo, las incidencias de EICH tanto agudo como crónico son semejantes. Los TIR pueden contrarrestar el efecto negativo de los factores pronósticos peyorativos (presencia de ZAP-70, patrón no mutado, pérdidas en 11q o en 17p). Además, pueden ofrecerse a pacientes de edad más avanzada que los alotrasplantes convencionales<sup>48,104</sup>. No obstante, la indicación del trasplante alogénico debe restringirse a pacientes jóvenes con factores de mal pronóstico, en el contexto de ensayos clínicos controlados<sup>49,105</sup>. En un futuro próximo se deberá evaluar si los

tratamientos dirigidos contra dianas celulares o basados en el perfil de expresión génica confirman las perspectivas actuales tan prometedoras<sup>106</sup>.

### **1.3.11 Factores pronósticos<sup>107-109</sup>**

Como ya se ha referido, la historia natural de la LLC es muy variable<sup>108,110</sup>. Desde las primeras descripciones de la enfermedad se han intentado establecer factores pronósticos que puedan realizar una evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad y de probabilidad de muerte, con la intención de intentar aplicar un tratamiento más precoz y dirigido que permita aumentar la supervivencia global y la calidad de vida en los pacientes con formas más agresivas, así como poder predecir en qué casos se podrá determinar con fiabilidad la no necesidad de tratamientos posteriores.

El análisis histórico de los factores pronósticos en la LLC ha tenido dos fases claramente diferenciadas. Hasta finales de los años ochenta, la mayoría de los factores pronósticos se hallaban relacionados con la presentación clínica, la morfología celular, el patrón de infiltración de la médula ósea y la progresión linfocitaria en un periodo de tiempo determinado; algunos de ellos ya no se consideran relevantes<sup>111,112</sup>. En la década de los noventa y primeros años del siglo XXI se han añadido diversos factores pronósticos relacionados con el perfil inmunofenotípico, las características citogenéticas y el patrón mutacional del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Aún así, en la actualidad todavía se están validando nomogramas e indicadores que incluyen los factores clínico-patológicos que se utilizan más rutinariamente<sup>113</sup>. Una revisión excelente de los factores pronósticos con validez probada o posible ha sido publicada recientemente<sup>114</sup>.

## 1.3.11.1. Características clínicas

En la mayoría de las series publicadas los pacientes de sexo masculino presentan un curso clínico más agresivo y una supervivencia menor que las mujeres con LLC<sup>115,116</sup>. Hace más de 30 años Rai y Binet establecieron dos sistemas de estadificación que llevan su nombre a partir de los cuales los pacientes podían clasificarse en grupos de riesgo bajo, intermedio y alto según presentaran o no ciertas características clínicas (adenopatías, visceromegalias, anemia y trombocitopenia). En virtud de estas clasificaciones, muy utilizadas aún en nuestros días por su sencillez y aplicabilidad, se pueden definir diferentes estadios: inicial (Rai 0, Binet A), intermedio (Rai I- II, Binet B) y avanzado (Rai III-IV, Binet C) con medianas de supervivencia de 10-12, 7 y 1,5-4 años, respectivamente (Tablas 5 y 6)<sup>8,9</sup>. La crítica actual a estos sistemas de estadificación radica en su falta de capacidad para predecir qué pacientes pertenecientes a los estadios iniciales progresarán. Cabe recordar que, en la actualidad, más del 80% de los casos al diagnóstico son estadios A (0), ya que en muchos casos el diagnóstico se efectúa en el contexto de un análisis de rutina o por otras comorbilidades no relacionadas con la LLC.

**Tabla 5. Sistema de estadificación clínica de Rai**

Estadio	Características clínicas	Supervivencia media (años)
<b>0</b>	Linfocitosis periférica y en médula ósea*	10
<b>I</b>	Linfocitosis y adenopatías	7
<b>II</b>	Linfocitosis con esplenomegalia y/o hepatomegalia con o sin adenopatías	7
<b>III</b>	Linfocitosis con anemia** (hemoglobina < 11 g/dl) con o sin adenopatías, esplenomegalia o hepatomegalia	1,5-4
<b>IV</b>	Linfocitosis con trombocitopenia** (plaquetas < 100 x 10 <sup>9</sup> /l) con o sin anemia, adenopatías, esplenomegalia o hepatomegalia	1,5-4

\*Linfocitos > 5 x 10<sup>9</sup>/L en sangre periférica y > 30% de las células nucleadas en médula ósea.

\*\*Se excluyen las anemias o trombocitopenias inmunes.

Tabla 6. Sistema de estadificación clínica de Binet

Estadio	Características clínicas	Supervivencia media (años)
A	Linfocitosis periférica y en médula ósea* con < 3 áreas ganglionares afectas**. Ausencia de anemia y trombocitopenia	12
B	Linfocitosis periférica y en médula ósea* con ≥ 3 áreas ganglionares afectas**, con o sin esplenomegalia y/o hepatomegalia. Ausencia de anemia y trombocitopenia	7
C	Linfocitosis* con anemia*** (hemoglobina < 11 g/dl en varones y < 10 g/dl en mujeres) o trombocitopenia*** (plaquetas < 100 x 10 <sup>9</sup> /L), independientemente del número de áreas ganglionares afectas y de la existencia de hepatomegalia y esplenomegalia	2-4

\*Linfocitos > 5 x 10<sup>9</sup>/L en sangre periférica y > 30% de las células nucleadas en médula ósea.

\*\*Cada área cervical, axilar e inguinal (uni o bilateral), la esplenomegalia y la hepatomegalia suponen un área ganglionar (5 áreas en total).

\*\*\*Se excluyen las anemias o trombocitopenias inmunes

### 1.3.11.2. Características morfológicas

La LLC en transformación prolinfocítica comporta un peor pronóstico, al igual que las atípicas (> 15% de linfocitos de morfología no compatible con la LLC, por ejemplo linfocitos hendidos) respecto a las LLC de morfología típica<sup>117,118</sup>. Recientemente, se ha publicado que los pacientes con más de un 30% de sombras nucleares en la fórmula leucocitaria tienen más probabilidades de presentar un patrón mutacional de IgV<sub>H</sub> mutado y, por tanto, un mayor tiempo hasta recibir tratamiento y supervivencias mejores<sup>74</sup>.

El patrón de infiltración de la médula ósea puede ser nodular, intersticial, mixto (el más frecuente) y difuso. En la práctica, se debe considerar a los tres primeros como patrón no difuso, ya que las diferencias pronósticas se establecen entre los pacientes con patrón difuso frente al resto. En los pacientes tratados con fludarabina es habitual tras el tratamiento la persistencia de un patrón nodular (respuesta parcial nodular), que supone una respuesta de más calidad que la respuesta parcial. Como ya se ha referido, la presencia de un patrón de infiltración difuso se relaciona con un pronóstico peor<sup>58</sup>, un hecho no confirmado por otros<sup>59,60</sup>.

#### 1.3.11.3. Marcadores de proliferación o carga tumoral

Los recuentos linfocitarios elevados ( $> 30 \times 10^9/L$ ) y el tiempo de duplicación linfocitario inferior a 6 meses o un aumento de la cifra de linfocitos  $> 50\%$  en 2 meses se asocian con un pronóstico peor<sup>119</sup>, al igual que la elevación de los niveles séricos de la lacticodeshidrogenasa (LDH), de la  $\beta_2$ microglobulina<sup>10</sup>, de la timidinkinasa<sup>120</sup> y del CD23 soluble<sup>121-123</sup>.

#### 1.3.11.4. Marcadores de angiogénesis

La elevación de la densidad de la microvasculatura y los niveles altos del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se asocian, también, con un pronóstico desfavorable<sup>124,125</sup>.

#### 1.3.11.5. Pruebas de imagen

Las alteraciones en la TC abdominal son un factor pronóstico de progresión en los pacientes con LLC en estadio inicial, por lo que su inclusión en las pruebas iniciales de diagnóstico puede proporcionar información clínica relevante<sup>75</sup>. Aún así, existen controversias en cuanto a su indicación<sup>126</sup>.

#### 1.3.11.6. Expresión de CD38

Este marcador se expresa en diversas células hematopoyéticas como las progenitoras, las células tímicas, las células T y las células B activadas en sus estadios posteriores de diferenciación<sup>127</sup>. La determinación de la expresión del CD38 constituye una herramienta útil y fácilmente analizable para determinar el pronóstico de los pacientes con LLC<sup>64,128-132</sup>, aunque debido a que no se trata de un antígeno exclusivo de la célula proliferante de la LLC no debe analizarse de manera independiente sino mediante citometría de flujo de tres colores, junto con el CD19 ó el CD20 y el CD5, debido a la ya citada expresión en otras células mononucleares. Los pacientes CD38 positivos

presentan una supervivencia inferior y por tanto, el CD38 se ha invocado como marcador pronóstico en la LLC, al indicar una mayor agresividad de la enfermedad. Sin embargo, no existe un consenso si el punto de corte de positividad debe situarse en el 7%, en el 20% o en el 30%. A lo largo del curso de la enfermedad de un paciente pueden observarse diversos niveles de expresión del CD38, lo que disminuye su relevancia pronóstica<sup>133</sup>.

#### 1.3.11.7. Expresión de ZAP-70<sup>134-136</sup>

La proteína asociada a la cadena zeta (ZAP)-70 es una tirosina kinasa intracelular de la familia syk/ZAP, que se asocia con la cadena *zeta* del receptor de la célula T (TCR). Su expresión normalmente se halla restringida a las células T y NK, en las que inicia las vías de señalización de la célula T, produciendo la activación, diferenciación, proliferación y funciones efectoras de la célula en respuesta a la estimulación del TCR. Las células B de la LLC pueden expresar este marcador de un modo variable, aunque su positividad se ha demostrado como uno de los factores pronósticos más potentes en la predicción del curso de la enfermedad<sup>13,135,137-139</sup>. La expresión de ZAP-70 puede realizarse mediante técnicas moleculares de *western blot*, inmunohistoquímica, RT-PCR, microarrays de expresión y citometría de flujo<sup>140,141</sup>. Una de las debilidades de su determinación mediante citometría de flujo es la falta de reproducibilidad de los resultados, motivo por el que en los últimos tiempos diversos grupos de investigación han intentado estandarizar la metodología<sup>142</sup>. Es muy probable que una vez se haya conseguido, su determinación junto con otros marcadores clínicos y biológicos ayuden a los clínicos a evaluar de un modo más fiable el pronóstico en los pacientes nuevos diagnosticados de LLC. En los resultados publicados por el grupo del Hospital Clinic de Barcelona, con un punto de corte del ZAP-70 por citometría de flujo del 20% (una expresión superior comporta un pronóstico peor) se obtuvieron diferencias significativas

en lo referente a la supervivencia global y a la probabilidad de progresión en los pacientes con LLC<sup>13</sup>.

Sin embargo, tanto la expresión de CD38 como de ZAP-70<sup>14,143</sup> han producido ciertas controversias respecto a su valor pronóstico en la comunidad científica debido a: a) los diferentes resultados obtenidos con las mismas muestras en diferentes laboratorios (lo que indica falta de validez y reproducibilidad de las técnicas utilizadas)<sup>144,145</sup>, b) las variaciones temporales en la expresión del CD38<sup>146</sup>, c) se han definido diferentes puntos de corte en la expresión de CD38 (< vs > 7%; < vs > 30%) y en el ZAP-70 (el más aceptado es el nivel del 20%), d) es preciso una cuidadosa separación de las células T para la determinación de ZAP-70 mediante técnicas de citometría de flujo, lo que ha hecho que, aún recientemente, diversos expertos en este área intenten sistematizar el modo de determinación<sup>147</sup> y e) hay un 20-30% de casos discordantes entre los resultados de ZAP-70 proporcionados por el inmunofenotipo mediante citometría de flujo y el estado mutacional de IgV<sub>H</sub><sup>137,148,149</sup>.

En los últimos meses ha adquirido una relevancia especial el marcador CD49d, cuya expresión parece asociarse a un pronóstico peor<sup>66</sup>.

#### 1.3.11.8. Estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub><sup>150</sup>

Uno de los parámetros genéticos moleculares más importantes para establecer el pronóstico de los pacientes con LLC es el estado mutacional de los genes V<sub>H</sub><sup>20,151</sup>. En aproximadamente la mitad de los casos con LLC se observan mutaciones somáticas de la región V<sub>H</sub> del gen de la cadena pesada de las Igs. En 1999, Damle *et al* pusieron ya de manifiesto la importancia de este hecho como predictor de la evolución de la enfermedad<sup>12</sup>. Los casos no mutados se originan a partir de células del centro pregerminal y tienen claramente un peor pronóstico que las LLC mutadas, originadas a partir de células del centro postgerminal<sup>152,153</sup>. La definición del patrón mutado vs no

mutado reside en un punto de corte, definido arbitrariamente, por una homología mayor del 98% (no mutados) al gen más similar de la línea germinal, pero este dato es debatible y en el presente trabajo de tesis doctoral se analizarán otros puntos de corte que podrían proporcionar información adicional<sup>154,155</sup>.

Los pacientes con LLC y patrón no mutado presentan un curso desfavorable y una progresión más rápida, al contrario que los que exhiben un estado mutado, en los cuales la supervivencia es claramente mayor (Figuras 1 y 2). Además, se ha observado, que independientemente del estado mutacional, algunas regiones específicas V<sub>H</sub> se asocian con características clínicas y geográficas diferentes<sup>156</sup>. Tal es el caso de la familia V3-21, cuya implicación confiere un peor pronóstico independientemente del estado mutacional<sup>157,158</sup> y que, característicamente, es menos prevalente en los países del sur de Europa, como han confirmado los resultados de un trabajo reciente de un grupo italiano de estudio de la LLC, en el que, incluso, se observa que es menos frecuente en el sur que en el norte de Italia<sup>159</sup>. La razón de este peor comportamiento clínico de los pacientes con V3-21 puede residir en que las regiones que determinan la complementariedad (HCDR3) son más cortas y es posible que la influencia estimuladora de la misma de algún antígeno desconocido produjera la progresión de la LLC. Por otra parte, la afectación de las familias V1-69, aunque no parece tener una supervivencia inferior con respecto a los pacientes que expresan otros genes no mutados<sup>160</sup>, y V4-39 ocurre preferentemente en casos no mutados, mientras que la V4-34 y la mayoría de las VH3 frecuentemente contienen casos mutados (Tabla 7). Los pacientes con estado no mutado presentan un pronóstico malo después de la realización de un trasplante autólogo de precursores hematopoyéticos<sup>161</sup>, aunque el efecto injerto contra leucemia puede contrarrestar la resistencia terapéutica de estos pacientes si se

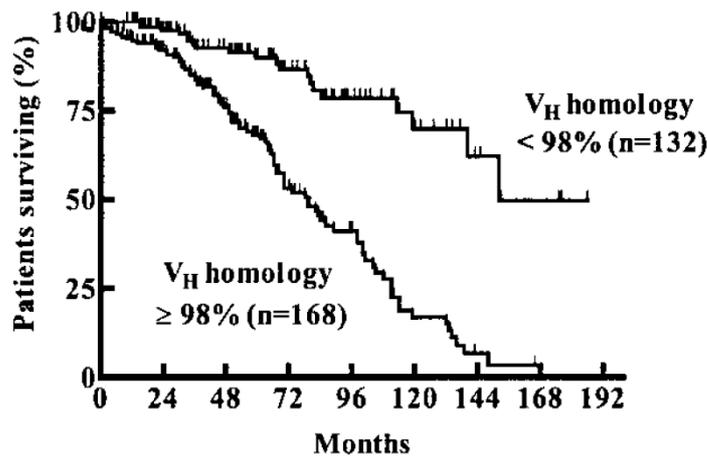
realiza un trasplante alogénico<sup>162</sup>. Los reordenamientos de VH3-48 y VH3-53 también se asocian con mal pronóstico<sup>163</sup>.

**Tabla 7. Características de los receptores de la célula B más frecuentes de la leucemia linfática crónica<sup>35</sup>**

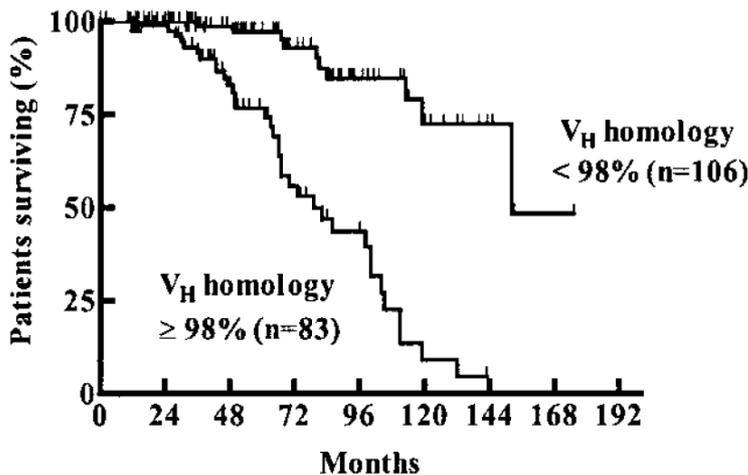
	LLC-B que expresan VH1	que expresan VH3	LLC-B que expresan VH4	que expresan los pares VHDJH/VLJL
<b>Familia más frecuente</b>	VH1-69	VH3-07	VH4-34	VH4-39 / VH3-21
<b>Estatus mutacional</b>	No mutado	Mutado	Mutado / No mutado	No mutado / Mutado
<b>Asociación D ó J</b>	D3-3 + JH6	JH4	JH4 / JH6	D6-13/JH5 / D?/JH6

\*Los reordenamientos que afectan a la familia VH1-69 son los más frecuentes de las LLC-B no mutadas, mientras que los que interesan a VH3-07 lo son de las LLC-B mutadas. Por otra parte, los reordenamientos de VH4-34 son los terceros en orden de frecuencia y pueden exhibir un estatus mutado o no mutado. Los VH4-39 y VH3-21 expresan genes D, J<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> y J<sub>L</sub>.

**Figura 1. Significado pronóstico de las mutaciones de IGVH en 211 pacientes pertenecientes al Grupo Alemán de Estudio de la LLC<sup>164</sup>**



**Figura 2. Significado pronóstico de las mutaciones de IGVH en 132 pacientes con LLC en estadio Binet A, pertenecientes al Grupo Alemán de Estudio de la LLC<sup>164</sup>**



1.3.11.9 Citogenética y FISH<sup>165,166</sup>

A finales del año 2000, el grupo alemán de la Universidad de Ulm publicó los resultados obtenidos en 325 pacientes con LLC y la relación de diversas alteraciones citogenéticas determinadas mediante FISH con la supervivencia<sup>19</sup>. Tras utilizar un panel de 8 sondas de FISH, que analizaban las pérdidas en 6q, 11q, 13q y 17p, las trisomías de 3q26, 8q24 y 12q13 y las traslocaciones de 14q32, observaron que el 82% de los pacientes presentaban alteraciones cromosómicas, algunas de las cuales tenían relevancia pronóstica<sup>167,168</sup>. Las alteraciones más frecuentes (55% de los casos) correspondían a la pérdida de 13q14, seguidas de la pérdida de 11q22-23 (18%), las trisomías del cromosoma 12 (16%), la pérdida de 17p13 (7%) y la pérdida de 6q21 (6%). Sólo 57 enfermos (18 %) no tenían alteraciones por FISH mientras que 67 y 26 pacientes tenían dos o más alteraciones citogenéticas, respectivamente. Las medianas de supervivencia de los pacientes con 17p-, 11q-, trisomía del cromosoma 12, citogenética normal y 13q- como alteraciones únicas fueron de 32, 79, 114, 111 y 133 meses, respectivamente (Figura 3). Además, los enfermos con 17p- presentaban el menor intervalo de tiempo hasta el primer tratamiento (9 meses), mientras que en los que tenían 13q- dicho periodo era el más prolongado de todos los grupos estudiados (92 meses) (Figura 4). En el análisis de regresión de Cox del tiempo de supervivencia, los pacientes con pérdida de 17p tenían una tasa de riesgo 8 veces mayor respecto al resto de enfermos, mientras que en los que presentaban pérdida de 11q la tasa de riesgo era algo inferior a 3.

Cabe destacar que algunas de las alteraciones citogenéticas se relacionan con características de la enfermedad: así, los pacientes con 11q- suelen tener linfadenopatía marcada<sup>169,170</sup> mientras que los enfermos con 17p- presentan resistencia a los tratamientos estándar, entre ellos a la fludarabina<sup>171</sup>. A pesar de que diversos grupos ya

habían analizado el valor pronóstico de algunas de las alteraciones citogenéticas que se observan en la LLC<sup>172-174</sup> y de que otros han reproducido los resultados del grupo de Döhner *et al*<sup>18,168,175-180</sup>, existen pocas series que permitan conocer qué ocurre con algunas alteraciones menos frecuentes en la LLC. Por otra parte, hay poca información relativa a la importancia de incluir la determinación de la traslocación 14q32/*IGH* en el estudio molecular de la LLC, aunque podría mejorar la precisión diagnóstica<sup>181</sup> y tener un valor pronóstico en los enfermos con LLC<sup>22</sup>. Recientemente, se ha demostrado que la presencia de traslocaciones cromosómicas se asocia con un pronóstico malo en los pacientes con LLC<sup>182</sup> y que la longitud de los telómeros constituye un factor pronóstico y se relaciona con el estado mutacional<sup>183,184</sup>.

**Figura 3. Probabilidad de supervivencia desde la fecha del diagnóstico de los 325 pacientes con LLC de la serie de Dohner et al<sup>15</sup>, según la categoría citogenética**

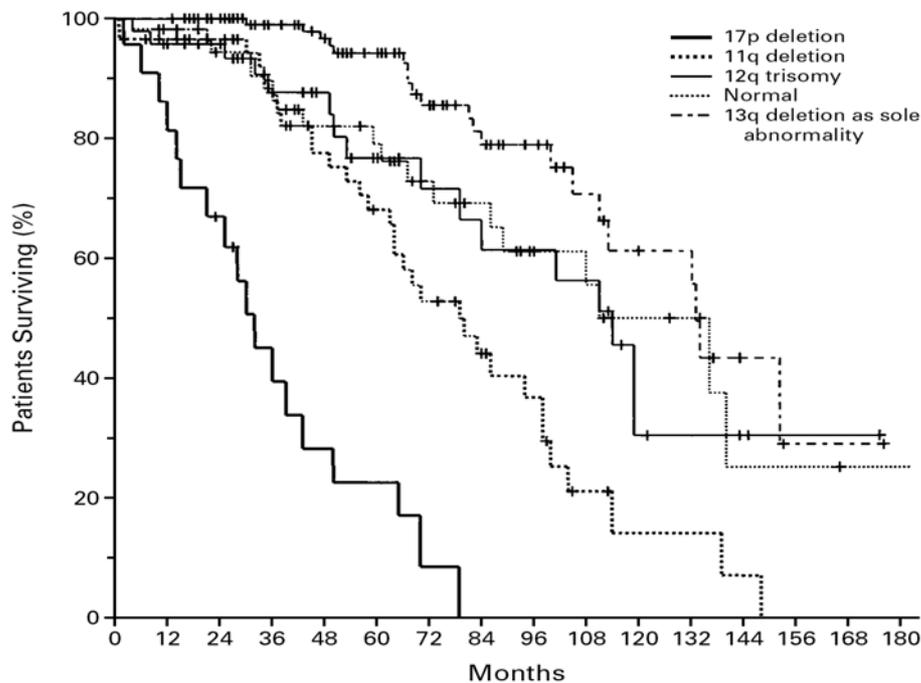
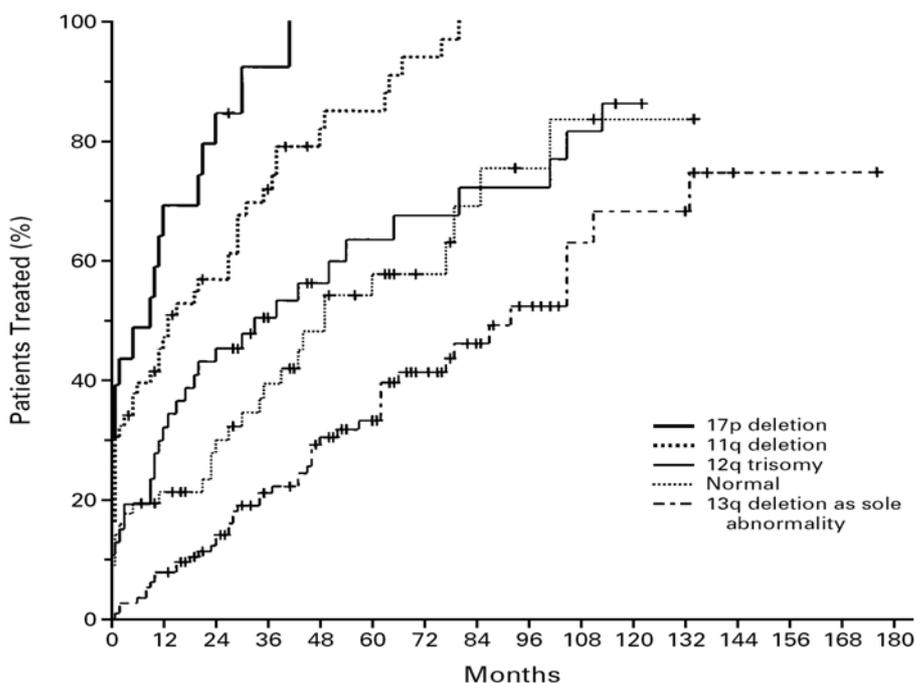


Figura 4. Probabilidad de progresión de la enfermedad, definida por intervalo libre de tratamiento, de los 325 pacientes con LLC-B de Dohner et al<sup>15</sup>, según la categoría citogenética



1.3.11.10. La relación entre los parámetros genéticos y sus marcadores auxiliares<sup>179,185</sup>

El estado mutacional de IgV<sub>H</sub> y las principales alteraciones citogenéticas separan dos grupos fundamentales a nivel pronóstico, lo que indica una correlación entre ellos<sup>164</sup>.

Así, las alteraciones de curso desfavorable, 11q- y 17p-, suceden con mayor frecuencia en los casos de LLC con patrón no mutado, mientras que los casos mutados son más frecuentes en los pacientes con pérdida en 13q, bien como única alteración o en combinación con otras. A pesar de ello, alrededor de dos terceras partes de los casos no mutados no presentan alteraciones de mal pronóstico, lo que indica el valor independiente del patrón mutacional y una influencia diferencial de este factor de riesgo (Tabla 8)<sup>20,186</sup>.

De todos modos, existen pocas series publicadas que analicen la influencia de los factores de riesgo tradicionales y los genético-moleculares. En una de ellas<sup>164</sup>, en el análisis multivariante de la supervivencia se seleccionaron el estado mutacional de

IgV<sub>H</sub>, la pérdida de 17p, la pérdida de 11q, la edad, el recuento leucocitario y la cifra de LDH, sin entrar en el modelo el estadio de Binet o de Rai. En otros estudios se ha observado el fuerte valor pronóstico y el impacto independiente de las alteraciones citogenéticas y del patrón mutacional.

Por ello, y a pesar de la ya mencionada heterogeneidad de la LLC, estos factores pronósticos deberían tenerse en cuenta en las estrategias futuras de tratamiento.

**Tabla 8. Incidencia de alteraciones genómicas y del estado mutacional de IgV<sub>H</sub> en la serie de la Universidad de Ulm y en diversos ensayos multicéntricos del Grupo Alemán de Estudio de la LLC<sup>187\*</sup>**

Estudio	13q <sup>-</sup>	13q <sup>-</sup> , única alteración	11q <sup>-</sup>	+12	17p <sup>-</sup>	Patrón no mutado	Patrón mutado
<b>Universidad de Ulm</b>	55 %	36 %	18 %	16 %	7 %	56 %	44 %
<b>CLL1#</b>	59 %	40 %	10 %	13 %	4 %	41 %	59 %
<b>CLL4&amp;</b>	53 %	34 %	21 %	11 %	3 %	69 %	31 %
<b>CLL3ε</b>	52 %	27 %	22 %	12 %	3 %	68 %	32 %
<b>CLL2HΘ</b>	48 %	14 %	32 %	18 %	27 %	81 %	19 %

\*Parcialmente modificado<sup>187</sup>

#Pacientes no tratados en estadio A de Binet sin indicación clásica de tratamiento.

&Pacientes menores de 65 años con estadios B y C de Binet con indicación de tratamiento, incluidos en el ensayo clínico aleatorizado fludarabina vs fludarabina + ciclofosfamida.

εPacientes menores de 60 años con estadio B y C de Binet que, como máximo, habían recibido una línea de tratamiento previo y que se incluyeron en un ensayo clínico de quimio-radioterapia mieloablative seguida de autotrasplante.

ΘPacientes refractarios a fludarabina con indicación de tratamiento incluidos en un ensayo clínico de alemtuzumab subcutáneo.

Uno de los inconvenientes de la realización de las mutaciones somáticas del gen IgV<sub>H</sub> es la laboriosidad que exige, lo que ha ocasionado que sea difícil de incorporar a la práctica clínica habitual<sup>150</sup>. Debido a ello, y en un intento de proporcionar la máxima información junto con las alteraciones citogenéticas evaluadas por FISH, se ha procurado disponer de marcadores auxiliares que pudieran mostrar una correlación alta con el estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub>. Así, hace unos años se demostró una cierta correlación entre la expresión de CD38 y el patrón no mutado<sup>12</sup>, aunque otros grupos no

observaron este hecho<sup>188</sup>. La expresión del ZAP-70 ha sido igualmente identificada y validada. En el trabajo publicado por Crespo et al en 2003, la expresión de ZAP-70 realizada por citometría de flujo se correlacionaba de forma muy potente con la ausencia de mutaciones somáticas de IgV<sub>H</sub>, por lo que se propuso como factor pronóstico de progresión de la enfermedad<sup>13,189,190</sup>. Sin embargo, en otros estudios la correlación encontrada es inferior, ya que existen un 25-35% de pacientes con LLC en los que la presencia de mutaciones no se asocia con negatividad de ZAP-70 y viceversa, lo que obligaría a realizar ambos marcadores. Las principales discrepancias se deben a que los enfermos con utilización del usado VH3-21 son en la mayoría de los casos mutados y, sin embargo, expresan el ZAP-70, mientras que, por el contrario, existen casos con pérdidas de 11q o de 17p no mutados que son negativos para ZAP-70<sup>137</sup>.

Debido a ello, se deben seguir investigando nuevos marcadores<sup>114</sup>, como la lipoproteinlipasa<sup>191-193</sup>, o el estudio de nuevos genes candidatos<sup>23</sup> que añadan información pronóstica a la predicción del riesgo en este grupo de pacientes<sup>194-198</sup>. Por último, el estudio de otros marcadores definidos por las nuevas tecnologías de microarrays, está permitiendo una mejor comprensión de la biología y el comportamiento de la LLC.

#### **1.4 El uso de las nuevas herramientas diagnósticas y pronósticas en la LLC**

En los últimos años se han producido avances en el estudio de los factores pronósticos de la LLC, como la detección en el 80% de los casos de alteraciones cromosómicas en estudios de citogenética convencional en metafase de linfocitos estimulados mediante oligonucleótidos<sup>199</sup> o la mejor caracterización de la relación entre el microambiente y la activación celular en la LLC<sup>31,33,34,36,37,124,125,200-212</sup>.

La secuenciación completa del genoma humano, conseguida en la última década, ha abierto un gran abanico de posibilidades para analizar, aplicando las nuevas tecnologías, de forma global una gran cantidad de genes en diversas neoplasias<sup>213</sup>.

Los microRNAs (miRNA) son una clase de RNAs que modulan la expresión de genes a nivel post-transcripcional. Estas moléculas se hallan implicadas en el cáncer, en la apoptosis y en el metabolismo celular. En la LLC se ha observado que los miRNA-21 y miRNA-155 se encuentran sobreexpresados, mientras que el miRNA-150 y el miRNA-92 se hallan significativamente disregulados<sup>214</sup>. También se han identificado un grupo de miRNAs cuya expresión se correlaciona con parámetros biológicos de relevancia, fundamentalmente con el estado mutacional de IgVH<sup>214</sup>.

Otro campo de desarrollo es el análisis de la expresión génica mediante microarrays de ARN, que ha permitido, en los pacientes con leucemia, mejorar el proceso diagnóstico y la clasificación de estas neoplasias<sup>215,215-224</sup>.

Aunque existe poca información al respecto, el hallazgo mediante los análisis de expresión génica con microarrays de un grupo de genes asociado con la supervivencia de los pacientes refleja el potencial de esta tecnología en la detección de nuevos marcadores que podrían tener relevancia pronóstica. En 2001, Rosenwald *et al*<sup>225</sup> y Klein *et al*<sup>226</sup> demostraron la asociación entre la expresión genética y el patrón mutacional y la existencia de un fenotipo homogéneo relacionado con las células B de memoria en los pacientes con LLC-B, respectivamente. Posteriormente, se observó que el estudio de los perfiles de expresión génica mostraba una firma molecular común en los pacientes con LLC-B, contribuía a la identificación de marcadores de progresión o era distinto en las LLC-B mutadas y no mutadas<sup>151,227-229</sup>. Además, los genes expresados de un modo más significativo se localizan en las correspondientes regiones

cromosómicas aberrantes, lo que indica que la existencia de un efecto genético de dosis puede ejercer un papel patogénico en la LLC<sup>230</sup>. Así mismo, se observó que había diferencias significativas en la expresión génica según el sexo, lo que podía sugerir que las diferencias en las firmas moleculares referentes al estado mutacional de IgV<sub>H</sub> podrían estar relacionadas con el sexo del paciente<sup>230,231</sup>. En los últimos años, además, se ha publicado el impacto que una firma de expresión de microRNA compuesta por un escaso número de genes puede tener en la diferenciación de pacientes con LLC-B con expresión o no de ZAP-70 y con un patrón mutado *vs* no mutado<sup>214,232</sup>. Este mismo miRNA puede también asociarse con la presencia o ausencia de progresión de la enfermedad<sup>233</sup>. Existen otras líneas de investigación abiertas relacionadas con el perfil epigenético de metilación<sup>234</sup> que están proporcionando un aumento de la información referente a esta enfermedad y que podrían tener un papel pronóstico<sup>235</sup>.

En conclusión, la genética molecular está permitiendo un mejor conocimiento de los factores pronósticos relacionados con la LLC-B, aunque se precisa de nuevas series que confirmen los resultados obtenidos, así como la correlación de los estudios citogenéticos “clásicos”<sup>236</sup> y el patrón mutacional de IgV<sub>H</sub> con los datos obtenidos en los perfiles de expresión mediante microarrays de ARN. Por otro lado, la aportación de nuevos factores pronósticos genéticos o biológicos puede favorecer un mejor conocimiento de esta enfermedad<sup>179,237-241</sup>.

## **2. Hipótesis**

A pesar de los notables avances que se han producido en los últimos años en el conocimiento de la biología y de los factores pronósticos de la LLC, existen numerosos aspectos por determinar. Aún se desconocen muchas de las rutas genéticas implicadas en esta entidad y si, en los diferentes subgrupos con alteraciones citogenéticas específicas, el porcentaje de células con pérdidas cromosómicas puede relacionarse con la supervivencia y con el tiempo hasta la progresión.

Hasta el momento actual, se estima que los pacientes con pérdida en el cromosoma 13q son los que presentan un pronóstico mejor, incluso superior a aquellos en los que no se evidencian aberraciones citogenéticas determinadas mediante FISH. Sin embargo, si se analizan en profundidad las diferentes series publicadas, en algunas de ellas se observa, más allá de los 10 años de seguimiento, un entrecruzamiento de las curvas de supervivencia y del tiempo hasta la administración del primer tratamiento, de los pacientes con LLC y pérdidas en 13q y de los que no tienen alteraciones citogenéticas, lo que podría indicar que, a largo plazo, los enfermos con cariotipo normal tendrían un mejor curso clínico.

Por otra parte, no se conoce con exactitud el comportamiento de los pacientes con alteraciones menos frecuentes, como las que afectan al cromosoma 14q32, lugar de reordenamiento del gen *IGH*. De hecho, del conjunto de las LLC, únicamente alrededor del 5-8% presentan alteraciones genéticas a este nivel, por lo que su análisis debe plantearse en el contexto de estudios multicéntricos con un número mayor de casos, que puedan evitar los sesgos de una casuística reducida.

Además, se desconocen muchos de los genes afectados en la LLC. La posibilidad de analizar en un solo experimento, mediante microarrays de expresión, el transcriptoma de los linfocitos B clonales de la LLC pudiera aportar información relativa a nuevos genes

o rutas genéticas implicadas en esta enfermedad. De hecho, algunas vías, como las que afectan al gen ZAP-70 se han estudiado exhaustivamente en la LLC, pero no así otras, que podrían proporcionar nuevos avances en el conocimiento de esta enfermedad.

Por todo ello, en el presente trabajo de tesis doctoral, se ha analizado una serie amplia de pacientes con un seguimiento adecuado para confirmar los resultados citogenéticos y moleculares comunicados hasta el momento por los principales grupos de estudio de la LLC. Además, se ha hecho especial énfasis en dos grupos de pacientes a los que hasta ahora no se ha dedicado especial atención. El primero lo constituye el grupo de enfermos con LLC y pérdida de 13q, para analizar si se trata de un grupo homogéneo o bien si el porcentaje de células con esta alteración permite separar pacientes con diferencias biológicas (diferente perfil de expresión génica) y pronósticas. El segundo es el de los pacientes con alteraciones en 14q32 que, aunque supone un grupo minoritario, tal vez se deba considerar independientemente, ya que podría presentar peculiaridades clínicas, biológicas y pronósticas diferenciadas.

### **3. Objetivos**

Profundizar en el conocimiento de las alteraciones genómicas de los pacientes con LLC mediante:

1. El estudio de las alteraciones citogenéticas detectadas mediante FISH y del estado mutacional del segmento variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas y de su relación con los factores pronósticos clásicos de la LLC.
2. El análisis de los pacientes con LLC con alteraciones en 14q32 para establecer las características clínicas y pronósticas de los enfermos con traslocación del gen *IGH*.
3. La evaluación de los pacientes con LLC y pérdida de 13q14 para determinar si el estado de heterocigosidad/homocigosidad y el porcentaje de pérdidas en 13q pueden tener valor pronóstico en cuanto a la supervivencia y el tiempo hasta el tratamiento.
4. El análisis del transcrito mediante microarrays de ARN para definir nuevas rutas genéticas y las regiones genómicas implicadas en la LLC en los casos con pérdidas en 13q14.
5. El estudio de los genes de la familia Vav y su relación con las principales alteraciones citogenéticas en la LLC.

## **4. Pacientes y Métodos**

## 4.1. Pacientes

De acuerdo con los objetivos planteados y debido a que la descripción de los resultados y la discusión de este trabajo de tesis doctoral se analizarán de forma separada, se consideraron cuatro grupos de pacientes.

### 4.1.1. Estudio de la serie global

Se incluyeron un total de 350 pacientes no seleccionados diagnosticados de LLC-B, estudiados consecutivamente, pertenecientes a 9 hospitales: 25 enfermos del Hospital Nuestra Señora de Sonsoles, Ávila, 14 del Hospital de El Bierzo, Ponferrada (León), 29 del Hospital Clínico de Valladolid, 40 del Hospital de León, 27 del Hospital Morales Meseguer (Murcia), 22 del Hospital de Plasencia (Cáceres), 24 del Hospital Río Hortega (Valladolid), 36 del Hospital General de Segovia y 133 del Complejo Hospitalario Universitario de Salamanca. El diagnóstico de LLC se estableció a partir de los criterios de la OMS y del Grupo de Trabajo del NCI, ya referidos previamente<sup>27,73</sup>. La única selección para su inclusión en el estudio fue disponer de estudio citogenético efectuado mediante FISH de las posibles alteraciones en 13q14, 11q (gen *ATM*), 17p13 (gen *TP53*), cromosoma 12 (C-12) y 14q32 (gen *IgH*).

Los datos clínicos se obtuvieron a partir de la revisión de las historias clínicas, usando una hoja de recogida de datos diseñada específicamente para este fin. En 282 pacientes (80,6%) la realización del estudio de la FISH coincidió con el momento del diagnóstico de la enfermedad y en la gran mayoría del resto (95% de los casos, correspondientes a los pacientes con más seguimiento) la FISH era normal o únicamente presentaba alteraciones en 13q.

La mediana de edad en el momento del diagnóstico era de 65 años (extremos: 29-90) y existía un predominio de varones: 232 (66,3%, ratio: 1,94). La mediana de seguimiento

se situó en 42 meses (extremos 2-312 meses), con 105 pacientes con más de 5 años de seguimiento.

El diagnóstico de LLC-B requirió la presencia de linfocitosis persistente (no necesariamente  $> 5 \times 10^9/L$ ) junto con un inmunofenotipo (realizado en sangre periférica) compatible. El panel de anticuerpos monoclonales incluyó la determinación de los Ags CD19, CD5, CD22, CD23, CD38, CD25, CD103, CD11c, FMC7, BCL2, CD10, CD20 y de las cadenas ligeras kappa y lambda. El 6,2% de los pacientes presentaban una puntuación de 3, según el sistema de clasificación de Matutes *et al*<sup>67</sup>, en el 52,8% era de 4 y, por último, el 41% de los casos tenían una puntuación de 5. Los estudios inmunofenotípicos se realizaron al diagnóstico en la mayor parte de los casos y en 190 casos incluyó la determinación del CD38.

En el momento del diagnóstico, la mediana de leucocitos era de  $19,4 \times 10^9/L$  (extremos, 5,3-370) y la de linfocitos de  $13,9 \times 10^9/L$  (extremos, 2,4-355). La mediana de la cifra de plaquetas de los pacientes de la serie se situó en  $184 \times 10^9/L$  (extremos, 2-554) y la hemoglobina en 14,3 g/dL (extremos, 6,5-17,5).

En 317 enfermos se realizó la prueba de la antiglobulina directa; en 17 de ellos (5,4%) el análisis resultó positivo. El 13,7% (47 de 343) de los pacientes presentaban niveles altos de la LDH al diagnóstico, mientras que la  $\beta_2$ microglobulina se hallaba elevada en el 37,4% (118 de 316) de los casos. El 8,3% y el 16,3% de los pacientes tenían hepatomegalia y esplenomegalia, respectivamente.

El 60,8% de los casos (212 pacientes) no presentaban linfadenopatías en ningún territorio al diagnóstico y sólo el 8,4% presentaban sintomatología constitucional. En 281 casos se realizó un estudio de la biopsia de médula ósea, en el que se puso de manifiesto que el 28,8% tenían un patrón de infiltración difuso.

Se clasificó a los pacientes según las clasificaciones de Binet y de Rai<sup>8,9</sup>. En el momento del diagnóstico, la mayoría (77,9%) de los pacientes pertenecían al estadio A de la clasificación de Binet, un 16,4% al B, mientras que el 5,7% restante estaban en estadio C. Si se tenía en cuenta la clasificación de Rai el 60,8% tenía un estadio 0, el 20,2% estadio 1, el 12,7% estadio 2, el 3,5% estadio 3 y, finalmente, el 3,2%, estadio 4. El 18,1% de los pacientes presentaron duplicación linfocitaria en menos de 6 meses en algún momento de su evolución y el 43,2% de los casos progresaron, igualmente, a lo largo del seguimiento. La progresión de la enfermedad se consideró de acuerdo a los criterios de Cheson et al<sup>242</sup>, revisados recientemente<sup>243</sup>.

Los esquemas de tratamiento utilizados fueron heterogéneos, de acuerdo con los criterios propios de cada uno de los centros de procedencia, y se basaron principalmente en el uso de alquilantes (clorambucilo) y análogos de las purinas (fludarabina). Al cierre del estudio 206 pacientes (58,3%) no habían recibido aún ningún tipo de tratamiento, mientras que a 144 enfermos se les había administrado, al menos, una línea de quimioterapia para el tratamiento de la LLC-B. El 8,3% de los pacientes presentaron segundas neoplasias, de las que las más frecuentes fueron otros síndromes linfoproliferativos (8 casos, con 4 linfomas de Hodgkin, 3 linfomas no hodgkinianos y 1 síndrome linfoproliferativo post-trasplante alogénico), tumores cutáneos (6 casos, 2 de ellos melanomas), cánceres de colon y de próstata (4 casos de cada uno de ellos). Otros tumores se localizaron en la vejiga (2), riñón (2), laringe (1), labio (1), estómago (1), pulmón (1) y mama (1). Un paciente desarrolló un síndrome mielodisplásico. Cabe destacar que un mismo paciente además de la LLC desarrolló un epiteloma basocelular de la piel, un cáncer de próstata y un linfoma difuso de célula grande (síndrome de Richter), que, finalmente, fue la causa de la muerte.

En el momento del cierre del estudio habían fallecido el 15,6% de los pacientes de la serie (54 enfermos), 34 de ellos debido a progresión, 8 a toxicidad por alguno de los tratamientos recibidos y 12 por causas no relacionadas con la LLC.

#### 4.1.2. Estudio de la serie de pacientes con alteraciones en 14q32

Con el objetivo de estudiar con más profundidad el subgrupo de pacientes con alteraciones en 14q32 se realizó un estudio cooperativo que incluyó pacientes de los Hospitales de Ferrara, Siena y Módena, de Italia. Para ello, se analizaron un total de 252 enfermos diagnosticados a partir de 2001, de los que 105 pertenecían a nuestra serie original. Del total de los pacientes, 206 tenían realizado el estudio de FISH en el momento del diagnóstico, mientras que la mediana de tiempo transcurrida entre el diagnóstico de la LLC y la realización de la FISH en los 46 pacientes restantes fue de 14 meses. Las principales características de la serie se resumen en la Tabla 9.

**Tabla 9. Características de los pacientes incluidos en la serie cooperativa de pacientes españoles e italianos para analizar las LLC con reordenamiento de 14q32 (IGH) (n = 252).**

<i>Variable</i>	
Mediana de edad (rango)	65,2 (30-90)
Sexo M/F	177/75
Leucocitos $\times 10^9/l$ (rango)	30,1 (4,8-369)
Hemoglobina g/dl (rango)	13,9 (4,2-17,9)
Plaquetas $\times 10^9/l$ (rango)	197 (15-554)
Estadio Rai 0-2/3-4	234/18
CD38 +/-	102/150

#### 4.1.3. Estudio de la serie de pacientes con delección en 13q como única alteración citogenética

De los 350 pacientes de la serie global, 109 enfermos presentaban 13q- como única alteración citogenética en el momento del diagnóstico. En 37 de estos casos se analizaron los perfiles de expresión genética por microarrays de expresión de

oligonucleótidos (15 enfermos con más de 80 % de pérdidas en 13q14 y 22 pacientes con menos de 80 % de pérdidas).

#### **4.1.4. Estudio de una serie de pacientes con enfermedades hematológicas para la caracterización de la proteína Vav**

El gen *VAV* se expresa en todas las células hematopoyéticas, aunque también lo hace en otro tipo de células. A pesar de que la desregulación de los genes de la familia *VAV* conduce a la transformación celular, existe poca información respecto a la implicación de las proteínas Vav en la génesis de los tumores humanos, aunque recientemente se ha demostrado que líneas celulares de neuroblastoma presentan la expresión ectópica de este proto-oncogén y que los tumores pancreáticos muestran sobrerregulación de este gen. Hasta el momento no se había demostrado la implicación del proto-oncogén *VAV* en neoplasias hematológicas.

Por ello se decidió su estudio en una muestra de 118 pacientes no seleccionados con diferentes tipos de neoplasias hematológicas. De ellos, 32 estaban diagnosticados de un síndrome mieloproliferativo crónico (SMP), 10 de leucemia linfoblástica aguda (LLA), 15 de diferentes tipos de linfoma no hodgkiniano (LNH) y los 61 pacientes restantes de LLC.

## **4.2. Métodos**

La metodología empleada en el estudio incluyó: a) la detección de las principales alteraciones citogenéticas mediante hibridación “in situ” fluorescente (FISH), b) el estudio de la presencia de mutaciones somáticas a nivel de la región variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas ( $IgV_H$ ) en un subgrupo de 224 pacientes, c) el perfil de expresión génica mediante el estudio con microarrays de expresión en un

subgrupo de 37 enfermos con pérdidas en 13q, d) la caracterización de la proteína Vav en un subgrupo de 61 pacientes, e) el análisis estadístico de los datos.

#### 4.2.1. Hibridación “in situ” fluorescente (FISH)

En el estudio de FISH se usaron sondas comerciales específicas (Vysis/Abbott Co, Downers Grove, IL, USA) de las regiones 13q14, 12q13, 11q22/*ATM* y 17p13/*TP53*, al ser las alteraciones más prevalentes desde el punto de vista citogenético en los pacientes con LLC-B. Igualmente, en todos los pacientes excepto en uno, se analizó la región 14q32/*IGH* con la intención de reconocer si las alteraciones en *IGH* podían tener un impacto pronóstico independiente.

##### 4.2.1.1. Metodología general

En la FISH se usó la metodología previamente descrita por nuestro grupo<sup>244</sup>, que, en resumen, consistió:

##### 4.2.1.1.1. Tratamiento y desnaturalización de las preparaciones

*Reactivos y soluciones:*

- Pepsina 10% (10 mg de pepsina en 100 ml 0,01 M HCl).
- 0,5 X SSC/Tween-20 (487,5 ml de agua destilada, 12,5 ml de 20XSSC, 50 µl de Tween 20).
- Solución de desnaturalización: 70% Formamida/2XSSC, pH 7 (70 ml de formamida, 10ml de 20XSSC, 20 ml de agua destilada)
- Etanol al 70% (dos soluciones, una a temperatura ambiente y otra a -20°C), etanol al 85% y etanol al 100%.

*Procedimiento:*

Se parte de la suspensión celular obtenida por los cultivos de medula ósea usados en la técnica de citogenética convencional<sup>245</sup>.

1. Depositar las células sobre los portaobjetos del mismo modo que para la citogenética convencional.

2. Incubar el portaobjetos en una solución de pepsina (5 µg) en 0,01N HCl, durante 10 minutos en un baño a 37°C en agitación.

3. Lavar con 0,5 X SSC/Tween-20 a 37°C en agitación durante 30 minutos.

4. Deshidratar con concentraciones crecientes de etanol: 70%, 85% y 100%.

5. Secar los portaobjetos.

6. Sumergir las preparaciones en un recipiente que contenga la solución de formamida al 70% e incubar a 73°C durante 2,5 minutos.

7. Deshidratar nuevamente las preparaciones realizando el primer paso con el etanol al 70%.

#### **4.2.1.1.2 Tratamiento y desnaturalización de las sondas a - 20°C**

1. Preparar la dilución de las sondas según las condiciones del fabricante.

2. Desnaturalizar en baño a 73°C durante 5 minutos.

3. Agregar la cantidad correspondiente de sonda al portaobjetos desnaturalizado.

4. Cubrir con un cubreobjetos y sellar con pegamento.

#### **4.2.1.1.3. Hibridación**

Introducir las preparaciones en una cámara húmeda e incubarlas durante 24 horas a 37°C.

#### **4.2.1.1.4. Lavados posthibridación**

*Reactivos y soluciones:*

- 0,1 X SSC/Tween-20 al 0,1% (497 ml de agua destilada, 2,5 ml de 20XSSC, 50 µl de Tween 20).
- 1 X PBS.

*Procedimiento:*

1. Precalentar la solución de 0,1 X SSC/Tween-20 a 65°C.

2. Eliminar suavemente el pegamento y el cubreobjetos de las preparaciones, introducir las en el recipiente que contiene la solución anterior y realizar un lavado de 5 minutos en agitación.

3. Lavar en la solución de 1 X PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

#### **4.2.1.1.5. Contratinción**

*Reactivos y soluciones:*

- Solución de contratinción: DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)
- Solución para mantener la fluorescencia (*antifade*): “VECTASHIELD” (Laboratorios Vector, Burlingame CA, USA).

*Procedimiento:*

1. Introducir los portaobjetos en un recipiente con la solución de contratinción durante 2 minutos en agitación y a temperatura ambiente.
2. Agregar 20  $\mu$ l de “VECTASHIELD” sobre el portaobjetos y cubrir con un cubreobjetos de 20 x 50 mm. Las preparaciones se deben mantener a 4°C y protegidas de la luz.

#### **4.2.1.1.6. Lectura e interpretación**

Se procedió a la lectura de 200 núcleos en cada uno de los casos analizados. Se consideró que el caso era positivo si el porcentaje de células con tres señales de hibridación era  $> 3\%$  en el caso de la trisomía 12, de una fusión, una señal roja y una verde, en las alteraciones en 14q32 y  $> 8\%$  de células con una señal en las pérdidas de 11q, 13q y 17p. Se repitió la hibridación en aquellos casos en los que el porcentaje de células con señales analizables era  $< 20\%$ .

#### **4.2.1.2. Métodos de la serie de pacientes con alteraciones en 14q32**

En el estudio de los enfermos con alteraciones en 14q32/*IGH*, con el objetivo de identificar la traslocación en el cromosoma con el que se traslocaba *IGH*, se utilizaron las siguientes sondas comerciales: 11q14/*BCL1*, 18q21/*BCL2*, 3q27/*BCL6*, 18q21/*MALT1* y 8q24/*MYC* (Vysis/Abbott Co, Downers Grove, IL, USA) y los siguientes BACs (*bacterial artificial clones*) no comerciales: RP11 158I21 y 440P5 para el mapeo de 2p12/*BCL11A*, RP11 696P19 / 298J23 / 533O20 / 7K24 para el de 6p21/*CCND3*, RP1121J15 / CTB129P6 / CTB179K24 para el de 19q13/*BCL3* y RP11 888H2/771F6 para el de 7q21/*CDK6*; se utilizó un grupo de 6 BACs (RP11 46O23 / 137P5 / 773M18 / 44H14 / 811I15) para la evaluación de la región 5p15.31-33, mientras que el BAC RP11 145B1 lo fue como control centromérico de la región 5p15.2. El análisis cromosómico convencional se realizó mediante la metodología habitual con el estudio de, al menos, 20 metafases en cada caso. A cada uno de los pacientes se le

asignó a un grupo de riesgo citogenético específico de acuerdo a la siguiente clasificación jerárquica: grupo desfavorable (11q-, 17p- o cariotipo complejo, si tenían, al menos, 3 alteraciones citogenéticas en el cariotipo); grupo intermedio (trisomía 12, 6q- ó 1-2 alteraciones cromosómicas en el cariotipo); grupo favorable (13q- como única anomalía, ausencia de alteraciones cromosómicas por FISH y citogenética convencional); grupo de traslocación 14q32/*IGH* (en la que no se incluyeron los casos con 11q- o 17p- concomitante, aunque sí los casos con trisomía 12, 6q- y/o 13q-, siempre y cuando éstas no fueran la alteración mayoritaria de la población clonal).

#### 4.2.2. Patrón mutacional de los genes $IgV_H$

A continuación se describen los diferentes pasos necesarios para determinar la secuencia del reordenamiento clonotípico del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que nos permitirá conocer, al comparar esta secuencia con la línea germinal, el porcentaje de mutaciones somáticas del clon tumoral linfocitario B de cada paciente. De acuerdo con las recomendaciones publicadas recientemente<sup>150</sup>, sólo cuando se pudo amplificar de forma completa el segmento variable utilizado en el reordenamiento clonotípico (*primers* FR1-JH, ver más adelante) el caso se consideró valorable para el cálculo del porcentaje de mutaciones somáticas.

##### 4.2.2.1. Obtención del ácido desoxirribonucleico (ADN)

La obtención del ADN se llevó a cabo a partir de una muestra de sangre total periférica, con más de un 10% de células tumorales detectables por citometría de flujo. Para la extracción de ADN se utilizó el *kit* comercial DNAzol<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

#### 4.2.2.2. Detección de clonalidad

El diagnóstico molecular de los distintos síndromes linfoproliferativos crónicos, entre ellos la LLC, se basa en el origen clonal de todas las células tumorales, ya que éstas derivan de una única célula progenitora, que ya ha completado el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas, tanto de la región variable, como de la región constante que determina el isotipo de la inmunoglobulina<sup>246</sup>. Por ello, todas las células pertenecientes al clon tumoral poseen la misma región CDR3, cuya secuencia puede identificarse a través de diversas técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de secuenciación.

Las técnicas habituales de PCR para los estudios de clonalidad se basan en el empleo de *primers* o cebadores consenso que se hibridan en las regiones más conservadas (regiones FR o “*framework regions*”) de la región variable del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas VH, combinadas con un *primer* consenso de la región JH que es común para todos los segmentos JH.

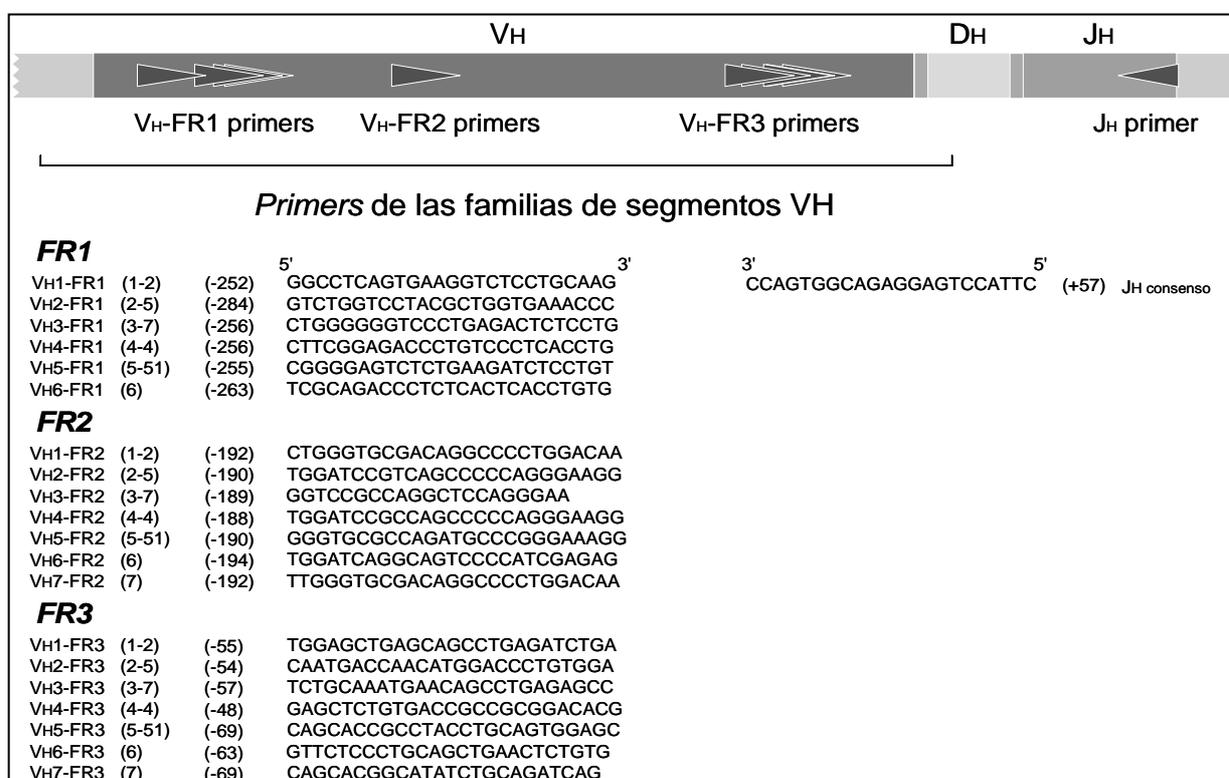
#### 4.2.2.3 Amplificación de reordenamientos clonales

Para detectar la clonalidad se empleó la estrategia descrita en el Proyecto Biomed-II (*Concerted action* BMH4-CT98-3936)<sup>247</sup>, donde se recoge exhaustivamente la metodología estandarizada así como la secuencia de los *primers* empleados para la amplificación de los reordenamientos clonales. Hay que tener en cuenta, que esta reacción amplificará el reordenamiento de todos los linfocitos B que hay en la muestra, de modo que únicamente si existe una población tumoral que destaca, aunque sea en pequeño porcentaje sobre el resto, se conseguirá distinguirla del total de reordenamientos policlonales. Dependiendo de la relación linfocitos clonales / linfocitos policlonales se obtendrá un producto clonal con más o menos fondo policlonal.

#### 4.2.2.4. Amplificación del reordenamiento completo VDJH

Para su detección, se empleó un tubo de PCR múltiplex con *primers* específicos para cada una de las familias de la región conservada FR1, combinados con un *primer* 3' JH consenso de acuerdo a las condiciones estandarizadas en el proyecto Biomed-II (Figura 5). Esta reacción de PCR amplifica, por tanto, todo el segmento variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, lo que permite detectar con precisión el porcentaje de mutaciones somáticas presentes en dicho segmento.

Figura 5. Estrategia Biomed-II para la amplificación de reordenamientos completos del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.



Cuando no se obtuvo amplificación desde la región FR1, se llevó a cabo la amplificación desde FR2 o FR3, que permite detectar la presencia de clonalidad (amplificación clonotípica VDJ), aunque no analizar el porcentaje de mutaciones somáticas con precisión y, por tanto, tampoco determinar si hubo selección antigénica.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador automático (PERKIN ELMER 2400) siguiendo el siguiente programa:

- Desnaturalización inicial a 95°C, 10 minutos
- 35 ciclos de tres etapas:
  - Desnaturalización: 94°C, 30 segundos.
  - Hibridación: 60°C, 30 segundos.
  - Extensión: 72°C, 30 segundos.
- Extensión final de 30 minutos a 72°C.

#### **4.2.2.5. Análisis y detección de los productos de PCR**

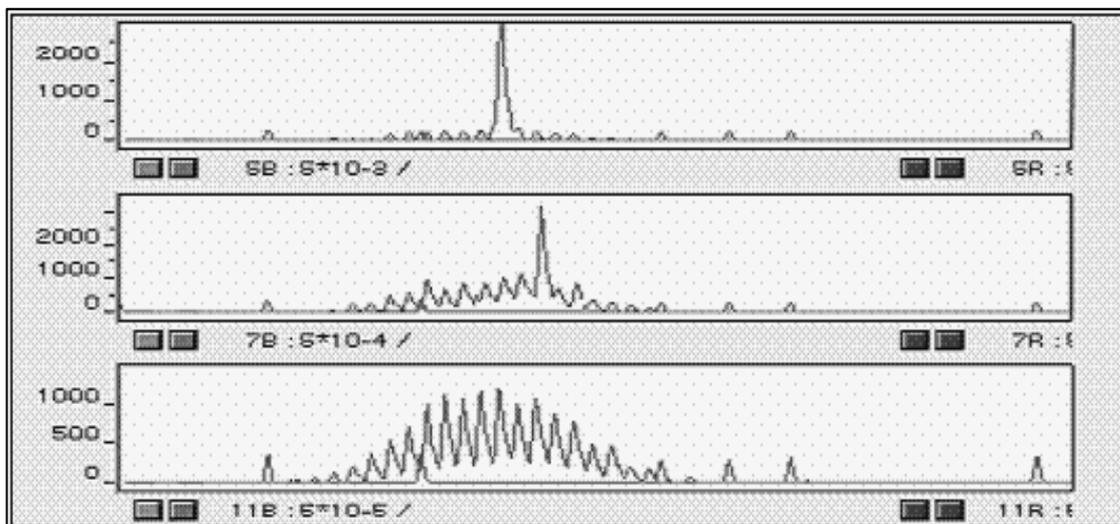
##### **4.2.2.5.1. Genescan**

Esta técnica, permite distinguir productos de PCR cuyo tamaño se diferencia en, al menos, dos bases. Tras la amplificación por PCR del reordenamiento clonotípico, empleando un *primer* marcado con fluorescencia (normalmente la JH consenso), se analiza el producto en un secuenciador automático equipado con un láser que detecta dicha fluorescencia. De este modo, un producto clonal aparecerá como un único pico de intensidad elevada, mientras que los productos policlonales se visualizarán como múltiples picos que forman una distribución gaussiana (Figura 6)<sup>248,249</sup>.

El análisis mediante Genescan se llevó a cabo con:

- 1 µl producto de PCR
- 2 µl de tampón de cargar que contiene: Internal Lane Standard 600 y Bromophenol Blue en una proporción 1:3.
- Electroforesis en el secuenciador automático ABI prism 377 Sequencer
- El análisis se realizó con el software GeneScan®3.1

**Figura 6. Detección de clonalidad mediante GENESCAN.** En el ejemplo se muestra el resultado tras el análisis por GENESCAN de los genes *IGH* (primers FR1 y JH) en una LLC-B clonal (arriba), un SLP-B clonal con fondo policlonal (centro) y en una muestra reactiva o policlonal (abajo)



Si se observa un producto clonal, para conocer la composición de las bases púricas y pirimidínicas que lo forman hay que secuenciar el reordenamiento clonotípico. Para llevar a cabo la secuenciación es necesario tener un producto clonal purificado, es decir, sin restos de los componentes de la reacción ni de otros reordenamientos policlonales que puedan interferir en la posterior reacción de secuenciación. Se purifica tras someter el producto de PCR a una electroforesis en un gel de poliacrilamida. Antes de cargar el gel, se provoca la formación de heterodúplex (detallado a continuación) a aquellas muestras que mediante el análisis de Genescan han mostrado un fondo policlonal, para tratar de eliminar éste. En el caso de que en el análisis del Genescan sólo se observe una banda clonal, el producto de la PCR se carga en el gel de poliacrilamida sin realizar previamente el heterodúplex. Si no se identifica claramente la banda monoclonal debido a la presencia de amplificaciones policlonales B, se procede a la realización de la técnica de heterodúplex.

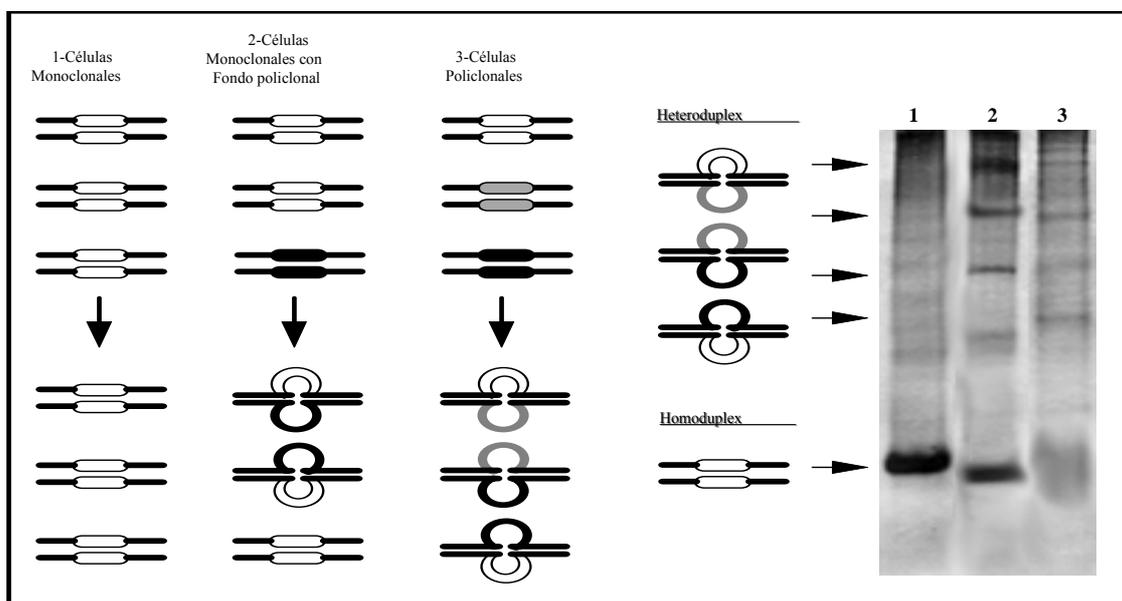
#### **4.2.2.5.2. Heterodúplex**

Esta metodología se basa en la capacidad de renaturalización del ADN tras someterse a altas temperaturas; el ADN obtenido tras la PCR se desnaturaliza a 95°C, para posteriormente renaturalizarlo rápidamente (4°C). Así, del producto de PCR se van a formar homodúplex, cuando se unen dos cadenas de ADN absolutamente complementarias, y heterodúplex en caso de que se unan dos cadenas de ADN que no son exactamente complementarias. Los homodúplex y heterodúplex formados son separados en geles de poliacrilamida basándose en la conformación adoptada por el ADN que va a determinar la forma de migrar en el gel (Figura 7). La presencia de bandas claras de homodúplex o bien de un conjunto de bandas difusas en el caso de los heterodúplex permite, al igual que el Genescan, aunque con menor sensibilidad, la discriminación entre clonalidad o policlonalidad, respectivamente. La intensidad de la banda de homodúplex después de la renaturalización de los productos de PCR está relacionada con el porcentaje de células B clonales presentes en la muestra. Al producirse apareamientos aleatorios entre los fragmentos de cadena simple de los linfocitos clonales y policlonales, la presencia de células B policlonales en la muestra llevará a la formación de heterodúplex. Cuanto mayor sea el número de células B policlonales en la muestra, menor será la cantidad de homodúplex formados (procedentes de células B clonales).

La purificación del producto se llevó a cabo:

- 30 µl producto de PCR (con o sin heterodúplex)
- 2 µl de tampón carga
- Gel poliacrilamida al 8%
- Tinción con bromuro de etidio
- Visualización ultravioleta
- Cortes de las bandas clonales

**Figura 7. Formación de homo y heterodúplex en células B monoclonales (1), en células B monoclonales con fondo policlonal (2) y en células B policlonales (3)**



#### 4.2.2.5.3. Secuenciación de reordenamientos clonales

Una vez que se ha confirmado la existencia de una población clonal y se ha obtenido la banda de poliacrilamida con el producto de PCR que corresponde al clonotipo, se procede a su secuenciación. El producto de PCR se eluye directamente del gel de poliacrilamida mediante la adición de agua desionizada y se somete a una reacción de secuenciación con *BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit*, siguiendo las indicaciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El producto de la reacción de secuenciación se purifica nuevamente para eliminar los restos de la reacción, en esta ocasión mediante precipitación con etanol. Una vez purificado el producto, se somete a electroforesis en un secuenciador automático (ABI prism 377 Sequencer, Applied Biosystems) para la detección de fluorescencia.

Cada clonotipo se secuencia al menos en dos ocasiones desde cada uno de los extremos 5' y 3' para evitar errores en la secuencia por fallos de la enzima Taq Polimerasa. En primer lugar, puesto que se desconocen los segmentos que forman el clonotipo, se

secuencia utilizando el *primer* correspondiente a la JH, ya que es común para los seis segmentos JH. Una vez que se obtiene la secuencia de la región VH o DH en los reordenamientos completos e incompletos respectivamente, se secuencia con un *primer* específico de familia, bien de DH, bien de VH, consiguiendo así la secuencia completa desde FR1 hasta JH.

Procedimiento:

- 5 µl del producto clonal eluido de la banda de poliacrilamida
- 2 µl *BigDye*<sup>®</sup> *Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit*
- 2 µl 5x Sequencing Buffer (*BigDye*<sup>®</sup> *Terminator kit*)
- 3 pmol *primer*

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700:

- Desnaturalización inicial: 94°C, 3 segundos.
- Con 35 ciclos de tres etapas
  - Desnaturalización: 96°C, 10 segundos.
  - Hibridación: 50°C, 0,5 segundos.
  - Extensión: 60°C, 4 minutos.
- Electroforesis en el secuenciador automático ABI prism 377 Sequencer
- Análisis mediante el software ABI prism<sup>TM</sup>377 Collection

#### **4.2.2.5.4. Identificación de segmentos génicos y detección de mutaciones somáticas**

Tras la secuenciación automática y el análisis de cada una de las secuencias mediante el software ABI prism<sup>TM</sup> 377 Collection, se procedió a la comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias germinales descritas y almacenadas en bases de datos públicas. De este modo se identificaron los segmentos VH, DH y JH que participaban en los reordenamientos. Para identificar los reordenamientos completos, se compararon las secuencias con las que aparecen en V-Base (<http://vbase.mcr-cpe.cam.ac.uk>)<sup>250</sup>.

La nomenclatura utilizada para los segmentos VH se obtiene de los 39 segmentos VH funcionales descritos por Matsuda *et al*<sup>251</sup>, o de los 51 VH funcionales descritos por Cook y Tomlinson<sup>252</sup>.

Para el análisis de mutaciones somáticas, se observaron los posibles cambios entre la secuencia de cada paciente y la línea germinal a la que más se asemejaba. Cuando dichas secuencias tenían una homología entre sí inferior al 98%, se consideró que el segmento VH estaba mutado. El corte del 98% de homología se estableció debido a que los polimorfismos son bastante frecuentes en los segmentos VH y podrían ser la consecuencia de dicho grado de discrepancia con la línea germinal publicada<sup>253</sup>.

En el presente trabajo también se consideró el corte del 96%, para analizar posibles diferencias que pudieran tener un interés pronóstico.

#### 4.2.3. Análisis estadístico (FISH y mutaciones somáticas)

Los análisis estadísticos de los pacientes de la serie global se realizaron con el programa estadístico SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Se llevó a cabo un análisis descriptivo de todas las variables analizadas. Para evaluar las asociaciones estadísticas entre las variables categóricas se utilizaron la prueba de la chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher. Para las variables continuas se utilizó la prueba de Mann-Whitney y la T de Student. El análisis de correlaciones de la serie global se efectuó mediante la prueba de Levene. Las variables estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia global y el tiempo transcurrido hasta recibir el primer tratamiento se calcularon utilizando el método de Kaplan-Meier a partir del estadístico de contraste *Log-Rank*. Los valores de *P* menores o iguales a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. El análisis multivariante para el cálculo de la supervivencia global (SG) y

del tiempo hasta el primer tratamiento (TPT) se realizó utilizando el modelo de regresión de Cox, con la intención de identificar las variables pronósticas independientes. Posteriormente, se procedió a un análisis de frecuencias para estudiar las características de los pacientes respecto a las variables estudiadas.

En cuanto al análisis de la serie de pacientes con alteraciones en 14q32, los cálculos de la SG y del TPT se realizaron como SG 25% y TPT 25 %, en los que estos términos representaban el punto en el que el 25% de los enfermos habían fallecido o iniciado el tratamiento, respectivamente. En el estudio del subgrupo de pacientes con alteraciones en 14q32, el análisis se efectuó con el programa estadístico Stata 8.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

#### **4.2.4. Estudio del transcriptoma mediante microarrays de oligonucleótidos**

##### **4.2.4.1. Microarrays de RNA**

Las muestras de médula ósea de los enfermos se hibridaron con el biochip de oligonucleótidos Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix<sup>®</sup>, Santa Clara, CA, USA), que contiene 54.675 secuencias diferentes, que identifican aproximadamente 38.500 secuencias génicas. Para ello se utilizó el siguiente protocolo:

##### **4.2.4.1.1. Extracción del ARN total**

Se separaron las células mononucleadas por gradiente de densidad (Fycoll-Hypaque). Se congelaron un total de  $1 \times 10^6$  de células en 1 ml de trizol (Invitrogen Life Technologies, P/N 15596-18, Gaithersburg, MD, USA) a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se procedió a la extracción del ARN.

*Reactivos y procedimiento:*

1. Descongelar la muestra en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  y homogeneizarla con una jeringa de 0,5 mm.

2. Añadir 500 µl de isopropanol e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 13.000 g, durante 10 minutos, a 4°C, lavar el sedimento con 1 ml de etanol al 75% y centrifugar a 11000 g durante 5 minutos a 4°C.
4. Eliminar el etanol y dejar secar el ARN en hielo.
5. Disolver el ARN en 100 µl de H<sub>2</sub>O DEPC (Ambion, Austin, TX, USA).

#### 4.2.4.1.2. Purificación del ARN

Con este proceso se pretendió mejorar la calidad del ARN y asegurar una mejor hibridación sobre los microarrays. Se realizó mediante las columnas “RNeasy<sup>®</sup> Mini”, (Qiagen, P/N 74104, Valencia, CA, USA).

*Reactivos y procedimiento:*

1. Añadir 350 µl de *solución RLT* y mezclar.
2. Añadir 250 µl de etanol al 100% y mezclar.
3. Pasar el volumen total a una columna de purificación.
4. Centrifugar a 9.000 g durante 15 segundos.
5. Lavar con 500 µl de *solución RPE*.
6. Centrifugar a 9.000 g durante 15 segundos.
7. Repetir el lavado con *RPE*.
8. Añadir 30 µl de agua DEPC y pasar el ARN a un tubo nuevo.

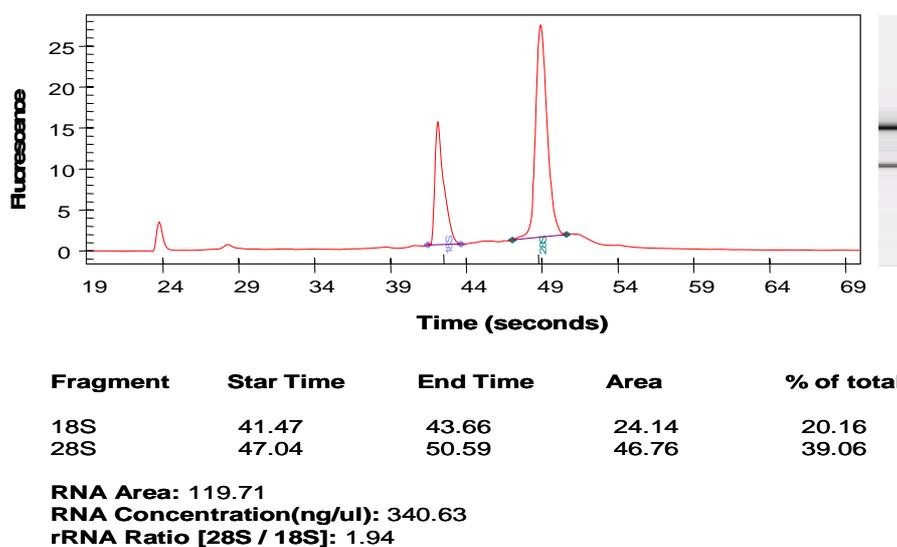
#### 4.2.4.1.3. Medida de la concentración y calidad del ARN

La evaluación de la integridad del ARN es un paso crítico en los análisis de la expresión génica. Para medir la concentración y al mismo tiempo valorar la calidad del ARN, se utilizó el sistema de Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA) con el kit “RNA 6000 Nano LabChip”, en el que se pueden medir hasta 12 muestras (1 µl por cada una) en un rango de concentración entre 25 y 250 ng/µl.

Para cada muestra el bioanalizador calcula automáticamente la ratio entre las áreas de las bandas ribosomales 28S y 18S, que idealmente debe estar entre 1,8 y 2,1. Este valor puede utilizarse como un parámetro de la calidad de la muestra. La variación de esta ratio puede indicar la degradación parcial de la muestra o la contaminación de la misma.

En los casos de degradación completa, las bandas llegan a desaparecer. Los picos más diferenciados y de mayor tamaño se corresponden con las fracciones ribosómicas 18S y 28S. La línea entre 29 segundos y la fracción 18S debe ser prácticamente recta y los picos pequeños corresponden a pequeñas moléculas de ARN (Figura 8).

**Figura 8. Medida de la cantidad y calidad del ARN mediante el bioanalizador 2100 de Agilent. La presencia de dos picos indica que el ARN aislado es de buena calidad.**



#### 4.2.4.1.4. Síntesis de ADNc a partir del ARN total

En todos los casos se partió de 2 µg de ARN total. La hibridación se realizó de acuerdo con el esquema propuesto por Affymetrix.

##### 4.2.4.1.4.1. Síntesis de la primera hebra de ADNc

1. Mezclar en un “eppendorf” la muestra (ARN) y el primer T7-(dT)<sub>24</sub>.
2. Incubar a 70°C durante 10 minutos
3. Enfriar la reacción en hielo durante 2 minutos.
4. Añadir 5X First Strand cDNA Buffer, DTT (0.1 M), dNTP mix (10 mM).
5. Incubar durante 2 minutos a 42°C.
6. Añadir 1,5 µl de SuperScript II RT.
7. Mezclar bien los reactivos y e incubar durante 1 hora a 42°C.

##### 4.2.4.1.4.2. Síntesis de la segunda hebra de ADNc

1. Enfriar la reacción.

2. Añadir H<sub>2</sub>O DEPC, 5X *Second Strand Reaction Buffer*, dNTP mix (10 mM) *DNA Ligase* (10 U/μl), *DNA Polymerase I* (10 U/μl), *RNase H*.
3. Mezclar bien, e incubar a 16°C durante 2 horas.
4. Añadir 2 μl (10 U/μl) de *T4 DNA Polymerase*.
5. Incubar 5 minutos más a 16°C.
6. Añadir 10 μl de 0,5 M de EDTA.

#### 4.2.4.1.4.3. Purificación de la doble hebra de ADNc

Se realizó a temperatura ambiente.

##### a) PLG (*Phase Lock Gels*)-Extracción con Fenol/Cloroformo

En la purificación con fenol/cloroformo, *PLG* forma una barrera inerte entre las fases acuosa y orgánica. A este gel, en alícuotas de 1,5 ml, se añaden la muestra y el fenol/cloroformo.

- a.1. Añadir el mismo volumen que el que tenemos de ADNc de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) a la muestra de ADNc y pasar al tubo *PLG*.
- a.2. Centrifugar el tubo de *PLG* a 13.000 g durante 20-30 segundos, para precipitar el gel.
- a.3. Transferir todo el volumen a otro tubo de *PLG*.
- a.4. No voltear, ya que este gel no debe llegar a ser parte de la suspensión. Centrifugar a 13.000 g durante 2 minutos.
- a.5. Transferir la fase acuosa que contiene el ADN a un tubo nuevo de 1,5 ml.

##### b) Precipitación del ADN con etanol

- b.1. Añadir 0,5 volúmenes de NH<sub>4</sub>AC 7,5M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío a la muestra y mezclar.
- b.2. Centrifugar a 13.000 g durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- b.3. Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento dos veces con 0,5 μl de etanol al 80% frío.
- b.4. Centrifugar a 13.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- b.5. Dejar secar el ADN.
- b.6. Resuspender en 12 μl de agua DEPC.

Se comprobó la síntesis correcta del ADNc en un gel de agarosa.

#### 4.2.4.1.4.4. Gel agarosa

Disolver 0,8 gr de agarosa (MS-12: Pronadisa) en 50 ml de TBE (Tris base 0,004 M; ácido bórico 0,001 M; EDTA 0,5 M; pH 8) con bromuro de etidio (0,5 mg/ml), para hacer un gel al 1,6%.

#### 4.2.4.1.5. Síntesis de ARNc marcado con biotina. Purificación y fragmentación

Una vez sintetizado el ADNc de doble cadena, se realizó una transcripción *in vitro* (IVT) y se marcó fluorescentemente mediante el kit de Enzo® (Enzo Biochem, Farmingdale, NY, USA). El resultado fue una amplificación lineal (entre 40-80 veces) del ARN.

##### 4.2.4.1.5.1. Transcripción “*in vitro*”:

*Reactivos y procedimiento:*

1. Mezclar el ADNc con 10X *HY Reaction Buffer*, 10X *Biotin Labeled ribonucleotides*, 10X *DTT*, 10X *RNase Inhibitor Mix*, 20X *T7 RNA Polymerase*.
2. Incubar a 37°C en un baño durante 5 horas, mezclando cada 45 minutos.
3. Una vez transcurrido el periodo de incubación, seguir con el proceso de purificación como se ha descrito en el apartado 1.4.2.

##### 4.2.4.1.5.2. Cuantificación del ARN:

La concentración del ARNc se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) en un espectrofotómetro. Hay que tener en cuenta que la absorbancia de una unidad a 260 nm se corresponde con 40 µg de ARN por ml.

$$[\text{ARN}] (\mu\text{g/ml}) = 40 \times A_{260} \times \text{factor de dilución.}$$

La relación entre los valores  $A_{260}/A_{280}$  fue aproximadamente 2. Los rangos entre 1,65–2,2 también son aceptables, para tener un ARN de buena calidad. La comprobación del ARNc se realizó en un gel de agarosa al 1%.

#### 4.2.4.1.5.3. Fragmentación del ARNc

Posteriormente, se procedió a la fragmentación de 25 µg de ARNc a 95°C con MgCl<sub>2</sub> 10mM; en este proceso se obtuvieron fragmentos de ARNc entre 35 y 200 pares de bases, que son los óptimos para la correcta hibridación en los chips. El ARN utilizado en la fragmentación tenía una concentración de 0,6 µg/µl, para mantener un volumen pequeño durante este proceso.

#### *Reactivos y procedimiento:*

1. Añadir 2 µl del 5X *Fragmentation Buffer* (200 mM Tris-acetate pH 8,1, 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc) por cada 8 µl de ARNc.
2. Incubar a 94°C durante 35 minutos. Enfriar en hielo después de la incubación.
3. Guardar una alícuota con, al menos, 1 µg de este ARNc fragmentado para correr en un gel de agarosa.

#### **4.2.4.1.6. Hibridación, tinción y lavado del array Human Genome U133 Plus 2.0**

Se hibridaron 15 µg del ARNc fragmentado, junto con los controles internos de la transcripción, hibridación y marcaje en el array durante 16 horas a 45°C con rotación constante a 0,4 g. Después de la hibridación, se realizó la tinción con estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) (10µg/µl) y anticuerpos anti-estreptavidina biotinilados (3 µg/µl). Tras las tinciones y lavados, estos chips se escanearon con un *GeneArray Scanner Version G2.500A* de Agilent. Cada chip se escaneó dos veces, durante 5 minutos cada vez y el resultado se comprobó con el programa *Microarray Suite 5.0* (MAS 5.0, Affymetrix), con el que también se realizaron los análisis de las intensidades absolutas de cada sonda.

#### **4.2.4.1.7. Análisis de los datos**

El análisis de los datos proporcionados por la hibridación de los microarrays es un proceso complejo en el que el sistema de hibridación facilita decenas de miles de

números para cada muestra. Por ello, es preciso seguir un protocolo de análisis que consta de los siguientes pasos:

#### **4.2.4.1.7.1. Selección de las sondas con señales de hibridación correctas.**

Se realizó automáticamente por el programa de Affymetrix. En todos los análisis sólo se utilizaron aquellas sondas que cumplieran los criterios de una hibridación de buena calidad:

- *Scaling factor* (SF) menor de tres veces, es decir, el SF más elevado no superaba en 3 veces al más bajo.
- Proporción entre la señal del extremo 3' de GAPDH y el extremo 5' superior a 2,5
- Número de sondas con hibridación de buena calidad superior al 40%.

#### **4.2.4.1.7.2. Normalización**

Para la normalización de los resultados se utilizaron dos algoritmos:

- RMA (*Robust Multichip Average*)

Este programa está integrado en el programa RMAExpress, que se puede obtener de manera gratuita en la dirección <http://rmaexpress.bmbolstad.com/>. Fundamentalmente, se utilizó este algoritmo.

- MAS5 (*Microarrays Analysis Suite*)

Este programa está disponible en la “suite” de Affymetrix denominada GCOs (*GeneChip Operating Software*), accesible en la dirección [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com).

#### **4.2.4.1.7.3. Filtrado**

Una vez normalizados los datos es preciso seleccionar aquéllos que son demostrativos del estudio que se está realizando. Los criterios usados para filtrar datos fueron:

- Eliminar todas aquellas sondas de baja intensidad; en nuestro caso se utilizó el criterio de eliminar todas aquellas sondas para las que el 100% de las muestras tienen una intensidad menor de 100.

- Eliminar las sondas que apenas presentan variación entre los arrays, es decir, que la diferencia entre la sonda que presenta mayor intensidad y la que presenta menor intensidad es muy pequeña.

La tabla de entrada en el filtrado fue el archivo obtenido de la normalización, mientras que el archivo de salida fue una tabla de similares características, pero con un número inferior de filas.

#### **4.2.4.1.7.4. Análisis no supervisados**

##### *a) Dendogramas*

El algoritmo usado en los análisis supervisados fue el agrupamiento jerárquico (*Hierarchical clustering*), que se aplicó con dos programas distintos:

- *Cluster & TreeView*. Este programa es de acceso libre y se obtiene en la página <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>. Para aplicarlo se partió del fichero generado tras el filtrado, se cargó el archivo en el programa y se seleccionó la pestaña “Hierarchical clustering”. El programa generó un archivo de salida que posteriormente fue abierto con la aplicación “Treeview” para poder visualizarlo.

- Plataforma R y las librerías *hopach* y *cluster*.

Este paquete de programas se obtuvo de las siguientes páginas: <http://www.r-project.org/>. y <http://www.bioconductor.org/>.

##### *b) Mapas de colores (heatmaps)*

Se obtuvieron con los programas referidos en el párrafo precedente y además con la aplicación *Genecluster*.

#### **4.2.4.1.8. Análisis supervisados**

Para verificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas se usó el algoritmo SAM (*significant analysis of microarrays*) de datos no apareados. Este algoritmo se ha utilizado desde dos programas: i) un programa de acceso libre que se

descarga en la dirección <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>. ii) desde la plataforma R (librería *siggenes*). En todos los casos sólo se consideraron significativas aquellas sondas que tenían un FDR (*false discovery rate*) inferior al 5%, es decir, las sondas en las que pudiera haber menos de un 5% de falsos positivos.

Para realizar el análisis por SAM se generó un archivo con una primera columna en la que se incluyó el identificador de la sonda, mientras que en el resto de columnas se incluyeron los datos del nivel de intensidad obtenido para cada sonda y cada muestra de los grupos que se compararon.

Los criterios seleccionados en el algoritmo fueron los definidos “por defecto” en el programa, basados en la realización de una prueba de la *T* de Student y 100 permutaciones del algoritmo. De esta manera se generó un archivo-tabla de salida que contenía la siguiente información: identificador del gen, *d-value* (o *score*) o marcador del cambio del gen para la comparación realizada, *p value* (significación muestral del *d-value*), y el *fold change* o medida del cambio del gen entre los grupos.

#### **4.2.4.1.9. Análisis de las rutas metabólicas**

Los distintos grupos de genes se agruparon funcionalmente de acuerdo con su función biológica a través del proceso Gene Ontology, accesible en la dirección [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org), así como del software *GeneCodis* (*Gene Annotation Co-occurrence Discovery*), una herramienta disponible en la web para el análisis ontológico de los genes.

El análisis funcional para identificar los mecanismos biológicos, las rutas metabólicas y las categorías funcionales de los grupos de genes seleccionados por el análisis estadístico se realizó a través del programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (Ingenuity Systems, Mountain View, CA, USA), accesible en la dirección [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com). A partir del archivo generado con el programa SAM, se

seleccionaron 4 columnas: i) el identificador de la sonda, ii) el valor del *d-value* o *score* del SAM para ese gen, iii) el valor de *P*, iv) el *fold change* del gen relativo a los dos grupos de muestras. El IPA permite agrupar los genes con expresión diferente en rutas metabólicas, asignando un color diferente (rojo o verde) en relación con el nivel de expresión.

#### 4.2.5. Caracterización de la proteína Vav

##### 4.2.5.1. Anticuerpos, extracción de la proteína y análisis mediante inmunoblot

Para evaluar el estatus de la vía de señalización de Vav, se obtuvieron lisados de células de la médula ósea. Posteriormente estos lisados se sometieron a un análisis de inmunoblot tras el uso de dos anticuerpos diferentes. La expresión total de la proteína Vav se monitorizó al incubar las muestras fraccionadas electroforéticamente con un anticuerpo policlonal que reconoce la región de dedos de zinc (*finger zinc*) de Vav. Para analizar la activación de Vav, se estudió el nivel de fosforilación del residuo clave de la regularización de Vav (Y<sup>174</sup>). Cuando se desfosforila, Y<sup>174</sup> establece interacciones intramoleculares con la región catalítica de Vav, que conducen a una conformación cerrada de Vav, que no es compatible con la unión de los sustratos GTPasa. Por el contrario, la fosforilación de este residuo rompe dichas interacciones intramoleculares, lo que conduce a una conformación abierta de Vav que puede unirse a las GTPasas Rho/Rac. Para seguir la pista de la fosforilación de este residuo en las muestras experimentales, se utilizó un anticuerpo anti-Vav fosfoespecífico, que reconoce al Y<sup>174</sup> fosforilado, pero no a otros residuos fosforilados de Vav o de otras proteínas de señal. Se estimó la igualdad de la carga de las muestras al teñir los filtros con solución S Ponceau y al analizar en paralelo los niveles de actina mediante inmunoblot. La relación de la fosforilación de Vav con los tipos específicos de tumores hematológicos utilizados

o con las diferentes alteraciones genéticas en los casos de las muestras procedentes de pacientes con LLC se llevó a cabo mediante la prueba de la  $\chi^2$ . Los valores de  $P$  iguales o menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

## **5. Resultados y Discusión**

## 5.1. El análisis de los factores pronósticos define nuevos grupos pronósticos en la LLC-B

### 5.1.1. Resultados

#### 5.1.1.1. Análisis de FISH

El estudio de FISH se realizó en los 350 pacientes con las 5 sondas referidas, con la excepción de un caso en el que no pudo realizarse el análisis de las alteraciones en *IGH*. Del total de enfermos de la serie, en 232 (66,3%) se observaron alteraciones citogenéticas mediante FISH. En 184 pacientes (52,6% del total; 79,3% de los que presentaban cambios citogenéticos) únicamente existía una alteración en la FISH, en 42 (12% del total; 18,1% de los que tenían alteraciones citogenéticas) había 2 anormalidades y en 6 enfermos (1,7% del total; 2,6% de los que presentaban alteraciones citogenéticas) se observaron 3 ó más aberraciones.

La alteración citogenética más frecuente fue la pérdida de 13q, que se evidenció en 162 pacientes (46,3%). En 42 enfermos (12%) se observó la presencia de trisomía del cromosoma 12, mientras que 30 (8,6%) tenían una pérdida de 11q y 20 casos (5,7%) traslocación de la región 14q32. Por último, en 15 enfermos (4,3 %) se observó pérdida de 17p (Tabla 10).

**Tabla 10. Alteraciones genéticas más frecuentes en los 350 pacientes de la serie diagnosticados de LLC**

	Nº de casos	%
Deleción 11q	30	8,6
Trisomía 12	42	12
Deleción 13q	162	46,3
Deleción 13q como única alteración citogenética	128	36,6
Deleción 13q como única alteración citogenética al diagnóstico	109	31,1
Deleción 17p	15	4,3
t (14q32)*	20	5,7
Citogenética normal	118	33,7

\*Realizada en 349 pacientes

De los pacientes con 13q-, en 128 casos (36,6%) esta alteración citogenética fue la única anomalía detectada y en 109 enfermos (31,1%) la única alteración evidenciada al diagnóstico de la LLC. En el 21,4% de los pacientes la delección de 13q era bialélica (homocigota), mientras que en el resto de los casos (78,6%) era monoalélica (heterocigota).

Con el fin de determinar si el número de células con pérdida de 13q podría relacionarse con características clínicas o biológicas distintivas, se realizaron diferentes cortes según el porcentaje de pérdidas de 13q (ver apartado 5.3, página 109).

#### **5.1.1.2. Estado mutacional de IgV<sub>H</sub>**

En 224 pacientes se analizaron las mutaciones somáticas del gen IgV<sub>H</sub>. Al considerar el porcentaje de mutaciones somáticas presentes en las secuencias y un punto de corte del 98%, 125 pacientes (55,8%) presentaban un patrón mutado y 99 (44,2%) no mutado. Cuando el punto de corte se situó en el 96%, 102 enfermos (45,6%) exhibían un estado mutado y 124 (54,4%) no mutado. En 8 pacientes (3,5%) no se pudo identificar la familia de genes VH que se empleaba en el reordenamiento. En los 216 enfermos restantes, los genes de la familia VH3 fueron los más representados (107 casos; 48,4%), seguidos de los de la VH1 (55 pacientes; 24,9%), de los de la familia VH4 (41 casos; 18,6%) y, con menor frecuencia, de VH5 (8 casos; 3,6%), VH2 (3 casos, 1,35%) y VH7 (2 casos; 0,9%). En la Tabla 11 se muestra la distribución de las familias de IgV<sub>H</sub> de acuerdo con el estado mutacional y el sexo de los pacientes.

Tabla 11. Estado mutacional (homología  $\geq 98\%$ ) y su relación con el segmento IgV<sub>H</sub> y el género de los pacientes

Usado IgV <sub>H</sub>	Patrón mutado	Patrón no mutado	Nº	%	Valor de P (mutados/no mutados)	Varón/Mujer (ratio)
VH1	2	5	7	3,2	ns	4/3 (1,33)
VH1-02	3	7	10	4,5	ns	5/5 (1,0)
VH1-03	2	2	4	1,8	ns	0/4 (a favor de ♀)
VH1-08	3	2	5	2,2	ns	3/2 (1,5)
VH1-18	2	2	4	1,8	ns	4/0
VH1-46	3	1	4	1,8	ns	3/1 (3,0)
VH1-69	3	18	21	9,4	< 0,0001	15/6 (2,5)
Total VH1	18	37	55	24,9	< 0,0001	34/21 (1,62)
VH2-01	1	0	1	0,4	ns	0/1 (a favor de ♀)
VH2-05	0	1	1	0,4	ns	0/1 (a favor de ♀)
VH2-70	0	1	1	0,4	ns	1/0
Total VH2	1	2	3	1,3	ns	1/2 (a favor de ♀)
VH3	3	2	5	2,2	ns	3/2 (1,5)
VH3-07	8	1	9	4	ns	9/0
VH3-09	2	2	4	1,8	ns	2/2
VH3-11	0	5	5	2,2	0,016	4/1 (4,0)
VH3-13	1	2	3	1,4	ns	3/0
VH3-15	4	2	6	2,7	ns	2/4 (a favor de ♀)
VH3-20	1	1	2	0,9	ns	1/1
VH3-21	6	1	7	3,2	ns	5/2 (2,5)
VH3-23	18	1	19	8,5	< 0,0001	12/7 (1,7)
VH3-30	12	10	22	9,8	ns	17/5 (3,4)
VH3-33	4	3	7	3,2	ns	5/2 (2,5)
VH3-48	1	2	3	1,4	ns	3/0
VH3-49	2	2	4	1,8	ns	1/3 (a favor de ♀)
VH3-53	1	0	1	0,4	ns	1/0
VH3-64	0	1	1	0,4	ns	1/0
VH3-72	2	0	2	1,8	ns	2/0
VH3-74	7	0	7	3,2	0,018	5/2 (2,5)
Total VH3	72	35	107	48,4	0,004	85/22 (3,86), p = 0,088
VH4-b	2	2	4	1,8	ns	1/3 (a favor de ♀)
VH4-04	5	0	5	2,2	0,051	3/2 (1,5)
VH4-30	1	1	2	0,9	ns	1/1
VH4-31	0	1	1	0,4	ns	1/0
VH4-34	14	4	18	8	ns	11/7 (1,6)
VH4-39	3	3	6	2,7	ns	3/3
VH4-59	2	0	2	0,9	ns	1/1
VH4-61	3	0	3	1,4	ns	2/1 (2,0)
Total VH4	30	11	41	18,6	0,022	23/18 (1,27)
VH5-05	0	1	1	0,4	ns	1/0
VH5-51	1	6	7	3,2	0,046	7/0
Total VH5	1	7	8	3,6	0,023	8/0 p = 0,05
VH7-04	0	2	2	0,9	ns	0/2 (a favor de ♀)
Total VH7	0	2	2	0,9	ns	0/2 (a favor de ♀)

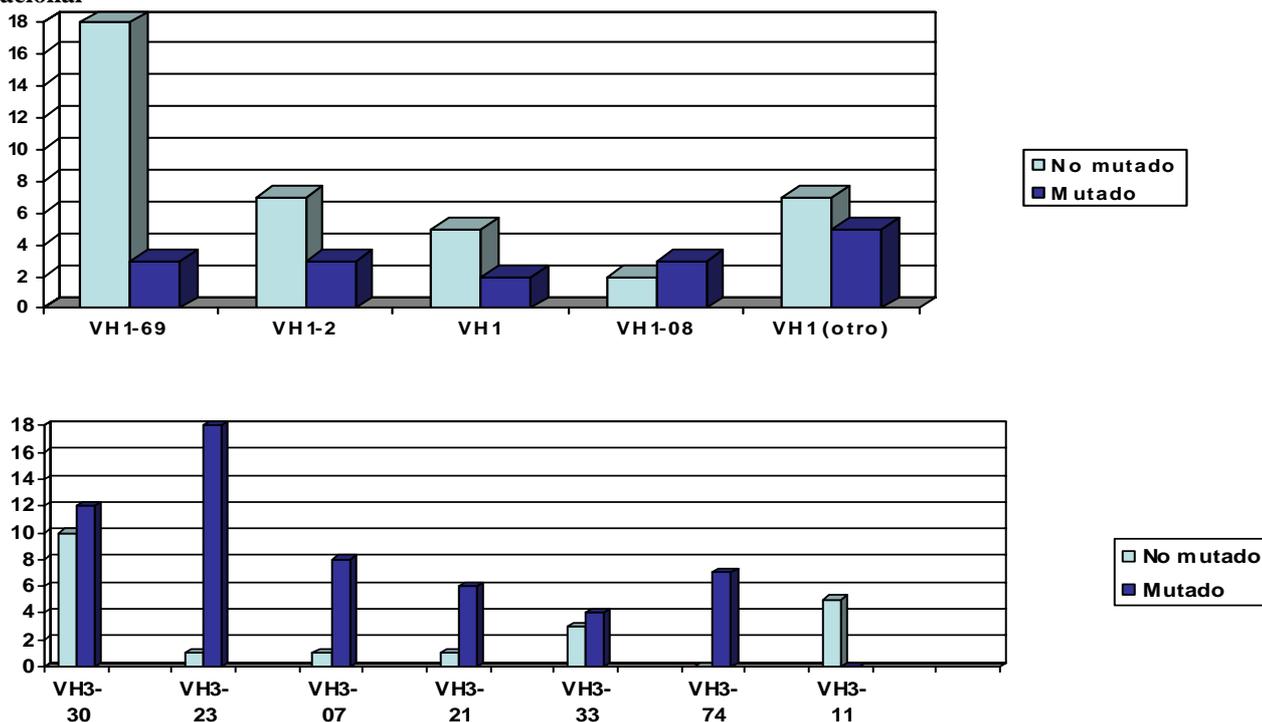
En cuanto a los hallazgos del estado mutacional de IgV<sub>H</sub>, cabe destacar:

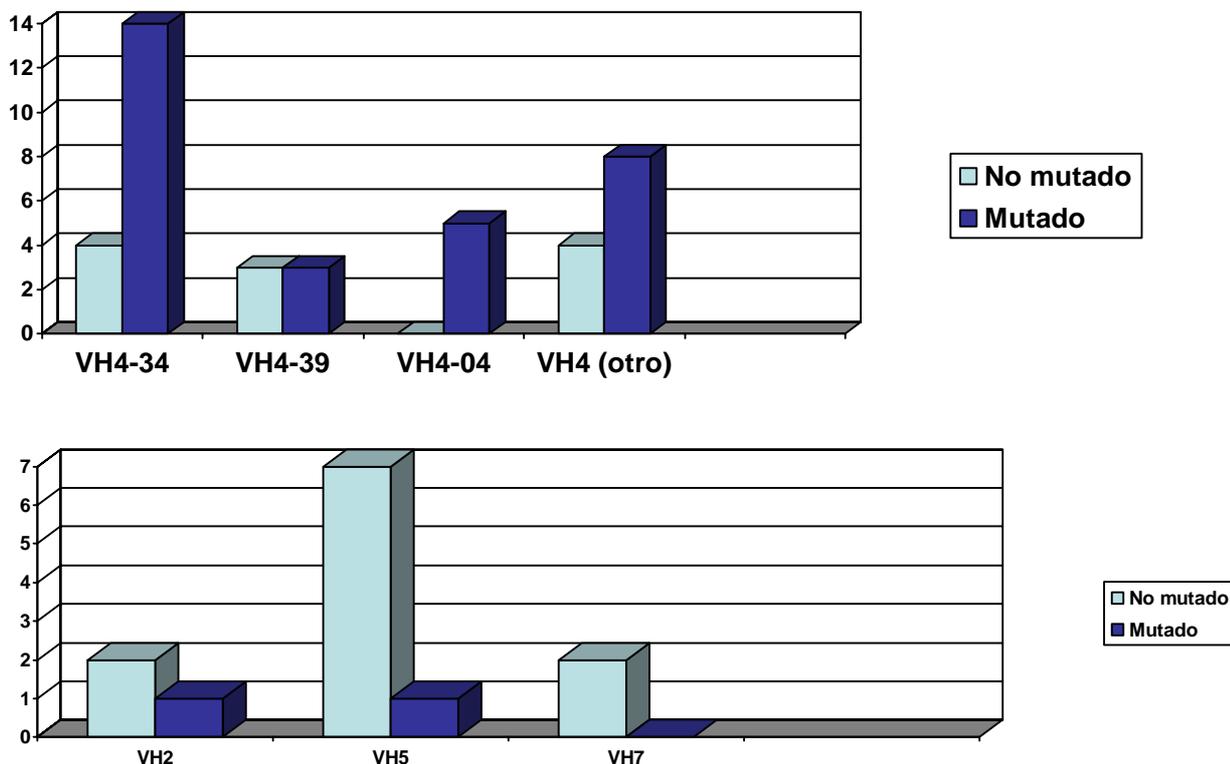
- Los pacientes con uso de familia VH1 presentaban patrón no mutado (37 vs 18 casos,  $p < 0,0001$ ). El segmento VH1-69 fue el más usado y se observó con más frecuencia en varones, aunque las diferencias no fueron estadísticamente

significativas ( $p = 0,63$ ) (38% de los casos de VH1, con un predominio mayor de formas no mutadas, 18 vs 3 casos).

- La familia más frecuentemente usada por los pacientes con LLC fue la VH3 (48,4% del total de los enfermos de la serie). Al contrario de lo que sucede con VH1, se asociaron a formas mutadas (72 vs 35 pacientes;  $p = 0,004$ ). Se observó una tendencia a ser más frecuentes en varones (relación 3,86:1;  $p = 0,08$ ). El segmento VH3-23 y el VH3-74 presentaron con mayor frecuencia patrón mutado, mientras que los 5 casos con VH3-11 fueron no mutados ( $p = 0,016$ ). El VH3-21 únicamente supuso el 3,2% de los casos de nuestro estudio y en todos excepto en uno, se observó patrón mutado.
- Los enfermos con VH4, más frecuentes en el sexo femenino, exhibieron con mayor frecuencia un patrón mutado (relación 3:1) ( $p = 0,022$ ).
- Los pacientes con LLC únicamente usaron la familia VH5 en el 3,2%. Característicamente, mostraron un patrón no mutado ( $p = 0,023$ ) y, en los pacientes de nuestra serie, los 8 casos se produjeron en varones ( $p = 0,05$ ).

Figura 9. Correlación entre el segmento VH empleado (agrupados por familias) y su estado mutacional





### 5.1.1.3. Expresión del antígeno CD38

En 190 pacientes se realizó el estudio del CD38 mediante citometría de flujo. Cuando el punto de corte se estableció en el 30% de células positivas, 48 pacientes (25,3%) eran CD38+ y 142 enfermos (74,7%) CD38-. Por su parte, cuando el punto de corte se fijó en el 7%, 84 pacientes (44,2%) eran CD38+, mientras que 106 casos (55,8%) eran CD38-.

### 5.1.1.4. Relación entre las variables clínicas, biológicas, genéticas e inmunofenotípicas

#### 5.1.1.4.1. Características clínicas y biológicas de los grupos citogenéticos de la LLC

Los enfermos con pérdida en 13q presentaban con mayor frecuencia patrones mutados de IgV<sub>H</sub> (p = 0,005), no expresaban el Ag CD38 (p = 0,004) y tenían una cifra de LDH normal (p = 0,003) (Tabla 12). Por el contrario, los enfermos con LLC y pérdida en 11q tenían patrón no mutado de IgV<sub>H</sub> (p = 0,003) y expresaban el Ag CD38 (p = 0,006).

Además, este grupo se caracterizaba por presentar esplenomegalia ( $p = 0,003$ ), mayor tamaño ganglionar ( $p = 0,002$ ), mayor linfocitosis ( $p < 0,0001$ ), menor tiempo de duplicación linfocitaria ( $p < 0,0001$ ) y progresión de la LLC ( $p < 0,0001$ ). De manera análoga, todos los enfermos con pérdida en 17p tenían patrón no mutado ( $p = 0,007$ ) y todos excepto uno positividad de CD38 ( $p = 0,0025$ ). Los pacientes con 17p- se caracterizaban también por tener niveles altos de LDH ( $p = 0,03$ ), de  $\beta_2$ microglobulina ( $p = 0,047$ ) y, al igual que el grupo anterior, menor tiempo hasta la duplicación linfocitaria ( $p = 0,009$ ) y progresión ( $p = 0,03$ ).

Los enfermos con trisomía del cromosoma 12 tenían con más frecuencia patrón no mutado de IgV<sub>H</sub> ( $p = 0,004$ ) y expresaban el Ag CD38 ( $p = 0,002$ ). Los casos con alteración t(14q32)/IGH no presentaron relación con ninguna otra variable de las analizadas, quizás debido al escaso número de enfermos con esta alteración citogenética. Por ello, se realizó un estudio más pormenorizado en este subgrupo de enfermos en el contexto de un análisis multicéntrico (ver apartado 5.2., página 98). Por último, los pacientes con citogenética normal mediante FISH presentaban un patrón de infiltración de la médula ósea no difuso ( $p = 0,026$ ) y un perfil de LLC típica ( $p = 0,039$ ).

**Tabla 12. Relación entre las alteraciones citogenéticas, el patrón mutacional y la expresión de CD38**

		FISH-mutaciones			FISH-CD38		
		Patrón mutado		Valor de p	CD38		Valor de p
		Sí	No		+	-	
<b>11q-</b>	+	2	15	0,003	7	4	0,006
	-	52	53		40	136	
<b>13q-</b>	+	23	11	0,005	8	56	0,004
	-	37	56		39	88	
<b>17p-</b>	+	0	8	0,007	5	3	0,025
	-	60	58		42	137	

#### 5.1.1.4.2. Características clínicas y biológicas de las LLC con patrón no mutado de IgV<sub>H</sub>

Los enfermos con LLC y patrón no mutado de IgV<sub>H</sub> (tanto si se establece el punto de corte en el 2% o en el 4%) tenían más linfocitosis (mediana de  $31,5 \times 10^9/L$  vs  $21,2 \times 10^9/L$ ;  $p = 0,038$ ). Además, como se ha referido, en este grupo se observaba con más frecuencia la pérdida de 11q, de 17p o la trisomía del cromosoma 12 (Tabla 12). Así mismo, presentaban niveles séricos de LDH más elevados ( $p = 0,003$ ), más estadios avanzados según la clasificación de Binet ( $p = 0,001$ ), más infiltración difusa de la médula ósea ( $p = 0,047$ ), menor tiempo de duplicación linfocitario ( $p = 0,001$ ), más progresión de la LLC ( $p < 0,0001$ ), y más segundas neoplasias ( $p = 0,016$ ). Los casos mutados se observaban con más frecuencia en pacientes que usaban las regiones VH3-23 ( $p < 0,0001$ ) y VH3-07 ( $p = 0,013$ ) y, con una tendencia a alcanzar la significación en los que usaban VH4-34 ( $p = 0,08$ ). Por el contrario, los usados VH1-69 ( $p < 0,0001$ ) y VH5-51 ( $p = 0,016$ ) se presentaban en casos no mutados.

En lo referente a los segmentos VH usados cabe destacar lo siguiente: la familia VH3-07 se asociaba con una menor cifra de linfocitos ( $p = 0,001$ ). Los enfermos con VH1-69 no pertenecían sólo al sexo masculino. En nuestra serie, de los 21 pacientes VH1-69, 15 eran varones y 6 mujeres (ratio: 2,5) ( $p = 0,63$ ). Este grupo de pacientes tenían una mayor probabilidad de recibir tratamiento ( $p = 0,02$ ) y más segundas neoplasias ( $p = 0,05$ ). Los pacientes con VH3-07 solían presentar patrón mutado ( $p = 0,013$ ); en nuestra serie los nueve casos eran varones ( $p = 0,03$ ) y progresaron menos que el resto ( $p = 0,043$ ). Los veintidós pacientes que usaron la región VH3-30 presentaban niveles normales de LDH ( $p = 0,05$ ), mientras que los VH3-23 tenían patrón mutado en todos los casos excepto uno (18 de 19) ( $p < 0,0001$ ). Debido al escaso número de casos del

patrón VH3-21 (un grupo que, clásicamente, a pesar de expresar patrón mutado se asocia a peor supervivencia) no se observó significación estadística en el estudio de correlaciones, aunque la mayoría de los casos presentaban un patrón mutado. Asimismo, cabe destacar que todos los casos con VH3-74 eran mutados. En los enfermos con VH4-34, se observó una tendencia a menor progresión de la LLC ( $p = 0,05$ ). Por último, cabe destacar que todos pacientes con el usado VH5-51 eran varones ( $p = 0,048$ ), tenían con más frecuencia un patrón no mutado ( $p = 0,016$ ) y la prueba de la antiglobulina directa positiva ( $p = 0,028$ ).

#### **5.1.1.4.3. Características clínicas y biológicas de las LLC en relación con la expresión de CD38**

Las LLC que expresaban CD38 mostraban con más frecuencia pérdidas de 11q ( $p = 0,006$ ), trisomía 12 ( $p = 0,022$ ) y deleciones de 17p ( $p = 0,025$ ), mientras que los casos CD38- se observaban en las LLC con pérdida de 13q ( $p = 0,004$ ). Además, los enfermos con expresión de CD38 presentaban niveles más altos de LDH ( $p = 0,01$ ), patrón histológico de infiltración de la médula ósea difuso ( $p < 0,0001$ ), progresión de la LLC ( $p = 0,002$ ), y patrones no mutados ( $p < 0,0001$ ).

#### **5.1.1.5. Estudios de Supervivencia**

##### **5.1.1.5.1. Análisis univariante de la supervivencia**

En el análisis univariante de la supervivencia se incluyeron las siguientes variables clínicas, biológicas y genéticas (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis univariante de la supervivencia de los 350 pacientes de la serie

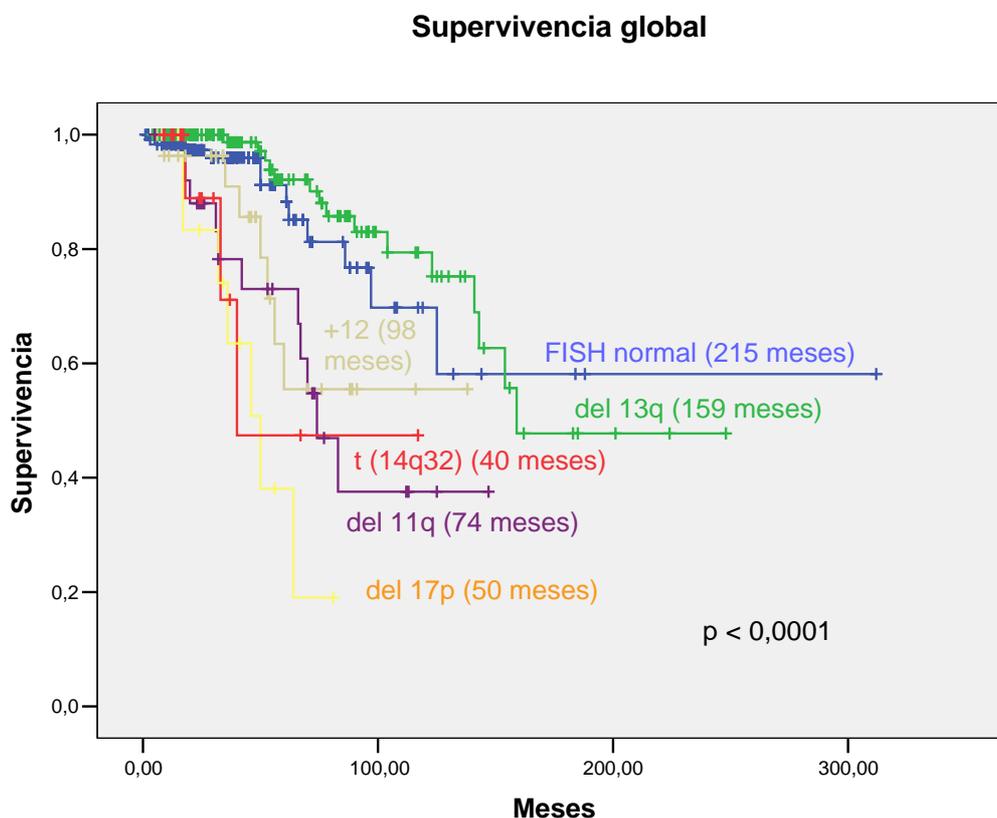
Variable	Mediana de supervivencia (meses)	Valor de P (log-rank)
Delección 11 q (+/-)	74/159	0,005
Trisomía 12 (+/-)	98/159	ns
Delección 13q (+/-)	159/NA	0,034
Delección 13q como única alteración +/-	159/125	0,001
Delección 13q como única alteración (% de interfases < 80/ ≥ 80)	NA/143	0,007
Delección 17p +/-	50/159	< 0,0001
t(14q32) +/-	40/154	ns
FISH normal/alterado	NA/143	0,036
FISH normal vs 1 vs 2 vs ≥ 3 alteraciones	NA/154/119/33	ns
VH1-69 +/-	86/154	0,032
VH3-07 +/-	100/154	ns
VH3-11 +/-	64/154	ns
VH3-21 +/-	154/NA	ns
VH3-23 +/-	143/NA	ns
VH3-30 +/-	159/154	ns
VH3-74 +/-	NC	ns
VH4-04 +/-	NC	ns
VH4-34 +/-	119/154	ns
VH5-51 +/-	70/NA	ns
Mutado/ No mutado (≥ 2%)	NA/117	0,027
Mutado/ No mutado (≥ 4%)	154/139	ns
CD38 (≥ 7%): -/+	154/97	0,05
CD38 (≥ 30%): -/+	154/67	ns
Sexo (♂/♀)	141/NA	0,014
Edad < 65 vs ≥ 65 años	159/104	0,004
Edad < 50 vs ≥ 50 años	NA/143	ns
Prueba de Coombs +/-	97/159	0,007
LDH sérica alta/normal	56/159	< 0,0001
β <sub>2</sub> microglobulina sérica alta/normal	86/NA	< 0,0001
Hepatomegalia sí/no	143/159	ns
Esplenomegalia sí/no	67/159	< 0,0001
Síntomas B sí/no	62/NA	< 0,0001
Estadio de Binet A/B/C	NA/75/52	< 0,0001
Estadio de Binet A vs resto	NA/74	< 0,0001
Estadio de Rai 0/1/2/3/4	NA/154/75/40/57	< 0,0001
Patrón de infiltración médula ósea (difuso vs no difuso)	97/NA	< 0,0001
FMC7 positivo/negativo/positivo débil/heterogéneo	142/197/104/168	ns
CD11c positivo/negativo/positivo débil/heterogéneo	181/156/152/186	ns
Score de LLC (Matutes et al) 3, 4, 5	101/152/200	ns

ns: no significativa. NA: mediana no alcanzada. NC: no calculada por falta de casos en el grupo analizado

La Figura 10 refleja la supervivencia de los 350 pacientes de la serie global, cuya mediana de supervivencia fue de 154 meses, y los datos de los enfermos con 11q-, t(14q32)/IGH, 13q- y 17p- expresados como medianas. En los pacientes con trisomía 12

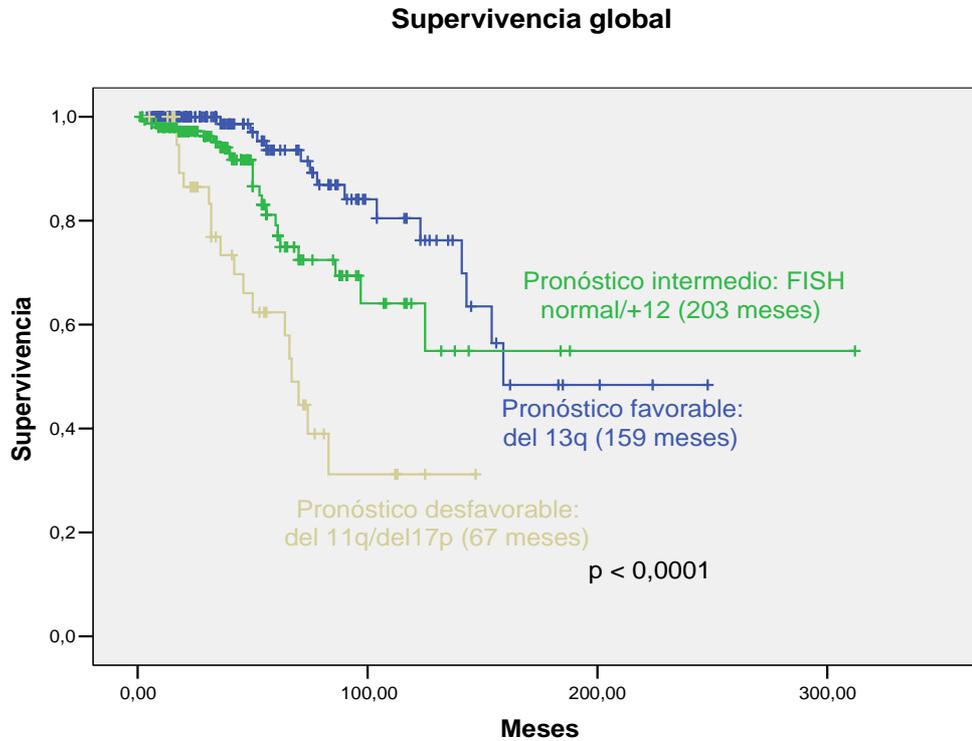
y citogenética normal, en el momento de la finalización del estudio no se había alcanzado la mediana de supervivencia.

**Figura 10. Supervivencia global de los pacientes de la serie de acuerdo con los hallazgos citogenéticos**



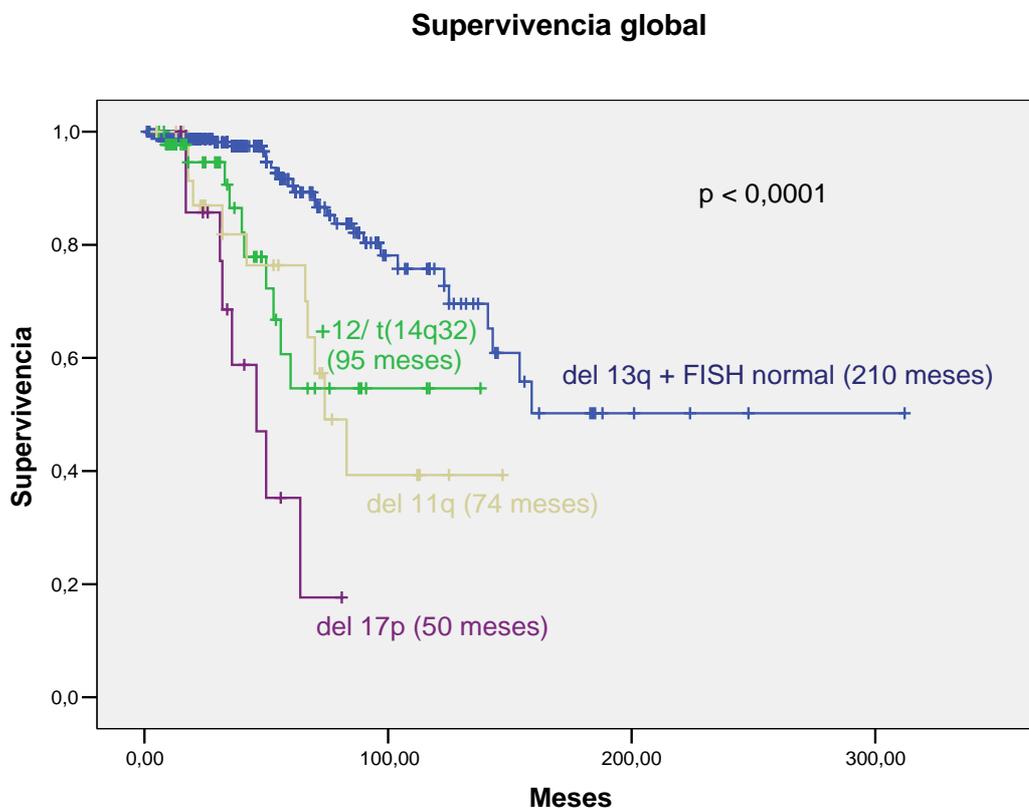
Por otra parte, en la Figura 11 se muestran las supervivencias de los 350 pacientes de la serie a partir de la clasificación jerárquica que divide a los enfermos según las alteraciones citogenéticas como de pronóstico favorable, intermedio y desfavorable. Como puede observarse, el grupo de pronóstico intermedio no había alcanzado la mediana de supervivencia (el resultado se expresa como media). Este mejor comportamiento se debe al porcentaje elevado de pacientes con citogenética normal, determinado mediante FISH.

**Figura 11. Supervivencia global según las alteraciones citogenéticas agrupadas en riesgo favorable, intermedio y desfavorable<sup>15</sup>**



En la Figura 12 se muestran las curvas de supervivencia si se agrupan los pacientes con cariotipo normal y 13q- como buen pronóstico (resultado expresado como media al no haberse alcanzado la mediana) frente al resto de alteraciones citogenéticas más frecuentes en la LLC (trisomía 12 + t(14q32) resultado expresado como media al no haberse alcanzado la mediana). Como puede observarse, los enfermos con pérdida en 17p tenían la supervivencia más corta, mientras que los casos con trisomía 12, alteraciones de IGH o pérdidas de 11q presentaban una supervivencia similar. El grupo de enfermos con 13q- o sin alteraciones citogenéticas tenían la supervivencia más prolongada.

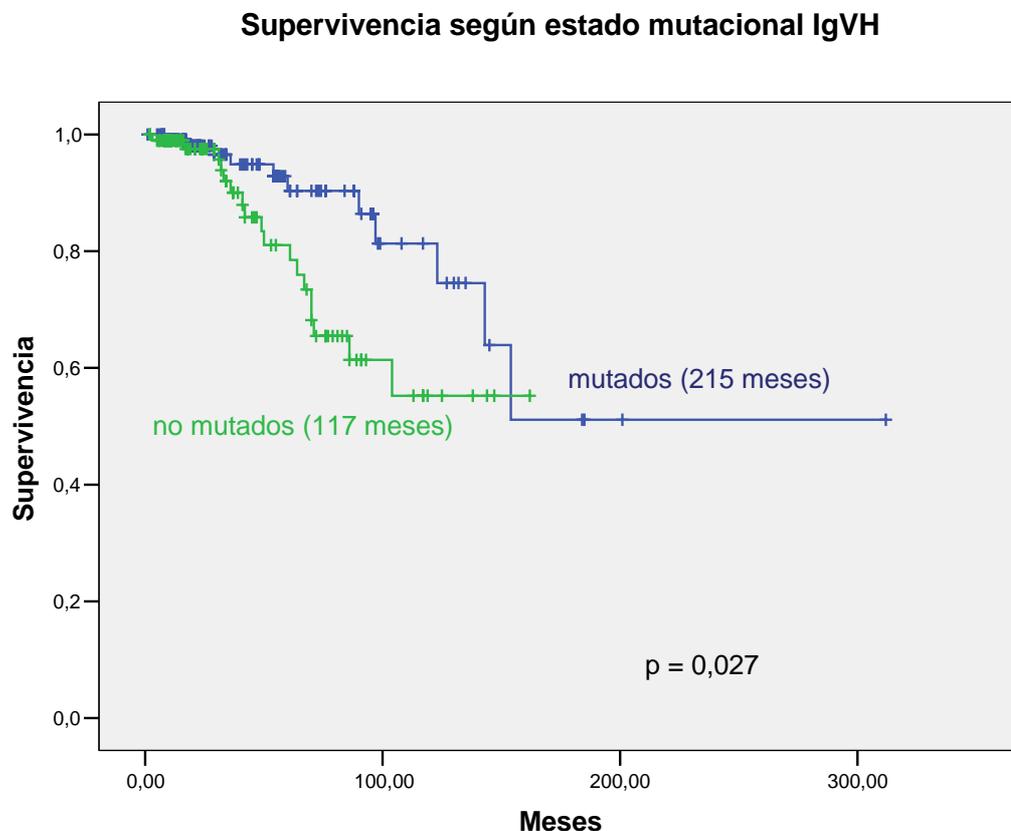
**Figura 12.** Supervivencia según grupo de buen pronóstico (deleción 13 q + citogenética normal), intermedio (trisomía 12 + alteraciones en 14q32), mal pronóstico (deleción 11q) y muy mal pronóstico (deleción 17p)



Con el objetivo de poder explicar la mejor supervivencia a largo plazo de los pacientes con cariotipo normal vs 13q-, se realizó un análisis de la supervivencia de los enfermos con 13q- según el número de pérdidas por FISH (ver apartado 5.3., página 109).

La supervivencia de los 224 pacientes a los que se realizó el estudio de mutaciones somáticas fue diferente en cada grupo cuando se estableció que la homología de IgV<sub>H</sub> era  $\geq 98\%$  (Figura 13). Sin embargo, no se observaron diferencias cuando el punto de corte entre los casos mutados y no mutados se fijó en 4 (homología  $\geq 96\%$ ). Por consiguiente, el estudio se centró en los grupos establecidos a partir de un punto de corte  $\geq 98\%$ .

Figura 13. Supervivencia de los pacientes de la serie según el estatus mutacional de IgV<sub>H</sub> (homología  $\geq 98\%$ )



#### 5.1.1.5.2. Análisis multivariante de los factores pronósticos relacionados con la supervivencia global

En el análisis multivariante de la supervivencia se incluyeron todas las variables que habían demostrado tener una relación en el análisis univariante: 11q-, 13q-, 17p-, cariotipo normal, VH1-69, estado mutacional de IgV<sub>H</sub>, CD38, sexo, prueba de Coombs directa, LDH,  $\beta_2$ microglobulina, esplenomegalia, síntomas B, estadio clínico y patrón de infiltración de la médula ósea. Las únicas variables relacionadas con una menor supervivencia que se incluyeron en el modelo final fueron presentar pérdida de 17p ( $p < 0,0001$ ) y la cifra elevada de la LDH ( $p = 0,007$ ).

La ecuación de regresión derivada de este estudio fue:

$$\text{Supervivencia} = -3,360 \times \text{deleción 17p} - 2,611 \times \text{LDH elevada} + \text{error}$$

Al realizar un análisis de las tasas de riesgo para la mortalidad, de nuevo se observó que la variable con mayor influencia era la pérdida de 17p, tal como se observa en la Tabla 14.

**Tabla 14. Tasas de riesgo para la supervivencia de los pacientes de la serie tras efectuar un análisis de regresión de Cox**

Variable	Tasa de riesgo para producirse la muerte (IC* del 95 %)
Deleción de 17p	7,03 (3,23-15,3)
Usado VH1-69	2,60 (1,04-6,44)
Deleción de 11q	2,52 (1,29-4,90)
Cariotipo normal	0,47 (0,23-0,97)
Deleción de 13q como única alteración	0,34 (0,18-0,64)
Patrón IgV <sub>H</sub> mutado	0,43 (0,20-0,91)

\*IC: intervalo de confianza.

#### 5.1.1.6. Estudios del tiempo hasta la progresión (primer tratamiento)

##### 5.1.1.6.1. Análisis univariante del tiempo hasta la progresión

Se analizaron las principales variables clínicas, biológicas y genéticas que se incluyen en la Tabla 15.

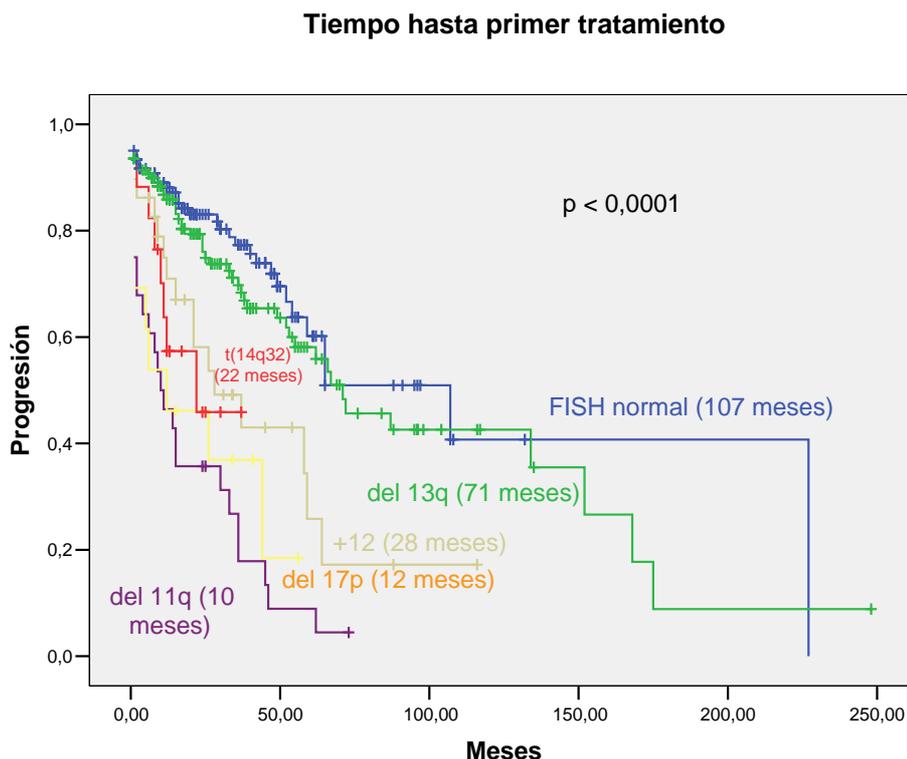
**Tabla 15. Análisis univariante del tiempo hasta el primer tratamiento de los 350 pacientes de la serie**

Variable	Mediana de tiempo hasta primer tratamiento (meses)	Valor de P (log-rank)
Deleción 11 q (+/-)	10/65	< 0,0001
Trisomía 12 (+/-)	28/65	0,011
Deleción 13q (+/-)	71/54	ns
Deleción 13q como única alteración +/-	71/59	0,021
Deleción 13q como única alteración (% de pérdidas < 80/ ≥ 80)	134/38	0,024
Deleción 17p +/-	12/65	< 0,0001
t(14q32)/IGH +/-	22/65	ns
FISH normal/alterado	107/46	0,001
FISH normal vs 1 vs 2 vs ≥ 3 alteraciones	107/53/34/12	ns
Familia VH 1 vs 3 vs 4 vs 5	34/59/65/9	0,002
VH1-69 +/-	28/58	0,008
VH3-07 +/-	96/77	ns
VH3-11 +/-	36/52	ns
VH3-21 +/-	19/79	ns (p = 0,07)
VH3-23 +/-	80/75	ns
VH3-30 +/-	59/52	ns
VH3-74 +/-	NC	ns
VH4-04 +/-	NC	ns
VH4-34 +/-	87/75	ns (p = 0,07)
VH5-51 +/-	9/54	0,012
Mutado/ No mutado (≥ 2%)	227/29	< 0,001
Mutado/ No mutado (≥ 4%)	227/33	< 0,001
CD38 (≥ 7%) +/-	36/65	0,003
CD38 (≥ 30%) +/-	36/65	0,03
Sexo (♂/♀)	52/67	ns
Edad < 65 vs ≥ 65 años	55/58	ns
Edad < 50 vs ≥ 50 años	67/58	ns
LDH sérica alta/normal	10/65	< 0,0001
β <sub>2</sub> microglobulina sérica alta/normal	30/107	< 0,0001
Hepatomegalia sí/no	11/62	0,003
Esplenomegalia sí/no	6/65	< 0,0001
Síntomas B sí/no	5/64	< 0,0001
Estadio de Binet A/B/C	67/11/1	< 0,0001
Estadio de Binet A vs resto	67/7	< 0,0001
Estadio de Rai 0/1/2/3/4	72/29/11/1/1	< 0,0001
Patrón de infiltración médula ósea (difuso vs no difuso)	11/71	< 0,0001
FMC7 positivo/negativo/positivo débil/heterogéneo	71/54/66/2	ns
CD11c positivo/negativo/positivo débil/heterogéneo	62/49/66/107	ns
Score de LLC (Matutes et al) 3,4,5	52/62/54	ns

ns: no significativa. NC: no calculada por falta de casos en el grupo analizado

El menor tiempo hasta la progresión correspondió a los pacientes con 11q-, con resultados semejantes al de los enfermos con 17p-. Por otra parte, los casos con citogenética normal y 13q- fueron los que presentaron un mayor tiempo hasta recibir tratamiento (Figura 14).

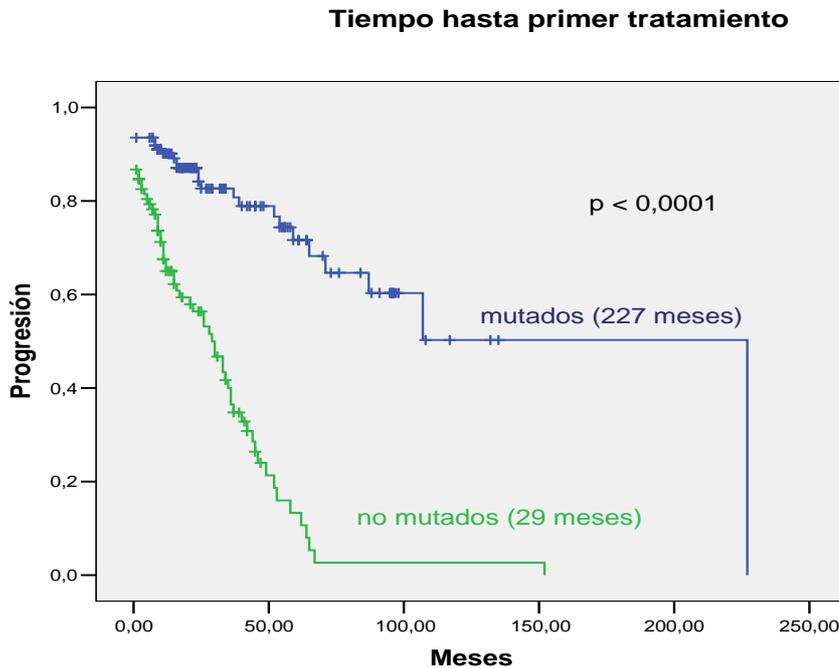
**Figura 14. Tiempo hasta el primer tratamiento (progresión) de los pacientes con LLC**



Al igual de lo sucedido en el caso de la supervivencia se realizó un análisis del tiempo hasta el primer tratamiento de los pacientes con 13q- según el número de pérdidas por FISH (ver apartado 5.3., página 109).

En lo referente a la progresión, en base al patrón mutacional de IgV<sub>H</sub>, se pusieron de manifiesto diferencias evidentes entre los pacientes con estado mutado y no mutado. En este caso, a diferencia de lo observado en la supervivencia global, tanto la homología  $\geq 2\%$  como la  $\geq 4\%$ , establecieron dos grupos de pacientes con distinto tiempo hasta el primer tratamiento (Figura 15).

Figura 15. Tiempo hasta el primer tratamiento de los pacientes de la serie según el estatus mutacional de IgV<sub>H</sub>



#### 5.1.1.6.2. Análisis multivariante de los factores pronósticos relacionados con el tiempo hasta el primer tratamiento

Todas las variables clínicas, biológicas, citogenéticas, inmunofenotípicas y el estado mutacional que demostraron estar relacionadas con el tiempo hasta el primer tratamiento se incluyeron en el análisis multivariante. Las variables relacionadas con un menor tiempo hasta la progresión que se incluyeron en el modelo final fueron la pérdida de 11q ( $p = 0,005$ ), de 17p ( $p = 0,017$ ), el patrón de IgV<sub>H</sub> no mutado ( $p < 0,0001$ ), el estadio de la enfermedad (Binet) ( $p < 0,0001$ ) y la cifra de  $\beta_2$ microglobulina elevada ( $p = 0,007$ ).

La ecuación que determinó el peso de cada una de las variables que influían en el tiempo transcurrido hasta recibir el primer tratamiento en el estudio multivariante fue:

Tiempo hasta el primer tratamiento =  $-0,837 \times \text{delección } 11q - 0,998 \times \text{delección } 17p - 1,575 \times \text{patrón no mutado} - 0,756 \times \beta_2\text{microglobulina elevada} - 1,403 \times \text{estadio clínico (Binet)} + \text{error}$

## 5.1.2. Discusión

### 5.1.2.1. Características generales de la serie

Como ya ha quedado referido, el pronóstico de los pacientes con LLC es muy variable, con enfermos que fallecen en 2-3 años y otros que lo hacen más allá de los 20 años desde el diagnóstico o bien mueren por causas no relacionadas con la enfermedad<sup>254</sup>.

Por este motivo se precisa estudiar nuevos factores pronósticos que ayuden a definir grupos de enfermos con LLC más agresivas en los que se plantee iniciar el tratamiento más precozmente.

Los resultados de nuestra serie son similares a los referidos en cuanto a las características clínicas y biológicas más relevantes de los enfermos con LLC<sup>12,15,88,109</sup>.

Al igual que ocurre con los estudios más modernos, el número de casos en estadios iniciales fue muy superior (78% de pacientes en estadio A de Binet) al de LLC avanzadas, lo que demuestra que el diagnóstico se realiza cada vez en fases más tempranas de la enfermedad.

La aplicación de las técnicas de citogenética y biología molecular ha determinado la presencia de lesiones moleculares en las LLC. Es interesante resaltar que, al contrario de lo que sucede con otras enfermedades hematológicas, entre ellas algunos linfomas no hodgkinianos, en la LLC no existe una única alteración genética que defina la

enfermedad, aunque es posible que los genes localizados en las regiones 11q y 13q puedan tener un ancestro común<sup>255</sup>.

En nuestro estudio fue posible determinar la presencia de clonalidad por alteraciones genéticas en cerca del 70 % de los enfermos con LLC mediante el uso de la FISH con las 5 sondas utilizadas (11q22-23, +12, 13q14, *IGH* y 17p13). Estos datos son similares a los referidos en otras series<sup>15,88,256</sup> (Tabla 8). En algunos de estos estudios se utilizaron hasta 3 sondas más de FISH, entre ellas la de la delección de 6q, no utilizada en la evaluación de los 350 enfermos de nuestra serie, porque esta alteración sólo afecta al 2% de los pacientes con LLC<sup>168</sup>.

En el 80% de los enfermos, las alteraciones citogenéticas fueron únicas, lo que implica que una quinta parte de los pacientes presentaron  $\geq 2$  aberraciones citogenéticas mediante FISH y confirma que la aparición de cambios múltiples en la LLC no es un hecho excepcional, además de comportar un peor pronóstico<sup>15,256</sup>. La alteración citogenética más frecuente fue la pérdida de 13q14, que se produjo en algo menos de la mitad de los enfermos y en el 36,6% era la única anomalía genética. La mayoría de los casos con pérdida en 13q presentaban esta alteración en sólo uno de sus alelos, si bien, un 20% tenían una pérdida bialélica, resultados similares a los descritos<sup>18</sup>. Los pacientes con alteraciones en 13q14 exhibieron con más frecuencia patrón mutado de  $IgV_H$ , negatividad para CD38 y LDH sérica normal. La frecuencia de las pérdidas en 17p (4,7%) y de los reordenamientos de la región 14q32 (5,7%) fue semejante a la publicada por otros grupos<sup>15</sup>, no así la de la delección de 11q21 que fue prácticamente la mitad (8,6%) que la que se observa en países más septentrionales, hecho ya descrito en el sur de Europa<sup>75</sup>. Por otra parte, la trisomía del cromosoma 12 se observó en el 12% de los enfermos, cifra algo inferior a la referida en otras series y que, probablemente, esté en relación con una mejor selección de los casos con LLC en el presente estudio, ya que

esta alteración citogenética puede observarse en otros síndromes linfoproliferativos crónicos B con expresión hemoperiférica<sup>257</sup>.

En cuanto al estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub>, un 56% de los pacientes de la serie presentaban un patrón mutado, cuando el punto de corte de la homología se estableció en el 98%. Esta incidencia es similar a la referida en otros estudios<sup>189,258</sup>. En la mitad de los casos el usado más frecuente fue VH3, seguido de VH1 (25%) y de VH4 (18,5%), resultados comparables a las de otras series<sup>159</sup> (Tabla 7). En nuestra serie, los usados de VH3 más frecuentes fueron VH3-23 y VH3-30, al contrario de lo descrito en la literatura en la que lo es VH3-07. Además, conviene resaltar que todos los pacientes de nuestra serie con VH3-11 eran no mutados, circunstancia que debería analizarse en series más amplias.

#### **5.1.2.2. Relación entre las características clínicas, biológicas y genéticas**

Los pacientes con alteraciones en 13q14 exhibieron con más frecuencia patrón mutado de IgV<sub>H</sub>, negatividad para CD38 y LDH sérica normal. Por otra parte, los que tenían pérdida en 17p o en 11q tenían expresión de CD38 y patrón no mutado de IgV<sub>H</sub>. Además, los enfermos con 11q- presentaron significativamente más linfocitosis y linfadenopatías, de manera similar a lo publicado<sup>169</sup>, mientras que los que tenían pérdida en 17p la cifra de LDH y  $\beta_2$ microglobulina era más elevada que en el resto.

En nuestro estudio se decidió usar un punto de corte del 98% de homología para las mutaciones de IGH, aunque se analizaron otros puntos de corte (como el 96% de homología). Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas respecto a la relación con otros marcadores pronósticos ni en cuanto a la supervivencia cuando se utilizaron otros puntos de corte, al contrario de lo que ha publicado el grupo inglés<sup>259</sup>. Los estudios que determinan las familias de los usados del gen IgV<sub>H</sub> son relativamente escasos, aunque parece que existen asociaciones geográficas, que necesitan confirmarse

en estudios adicionales<sup>156,260</sup>. Así, los pacientes con mutaciones en el segmento VH3 presentaban estado mutado con más frecuencia, incluyendo los VH3-21, un subgrupo más frecuente en los países del norte que en el sur de Europa<sup>260</sup>. En nuestra serie, únicamente 7 de los 226 pacientes estudiados tenían este segmento mutacional, de los que 6 eran mutados. Además, conviene resaltar que todos los pacientes de nuestra serie con VH3-11 eran no mutados, circunstancia que debería analizarse en series más amplias. La mayoría de las LLC con mutaciones en VH1 muestran el usado VH1-69 (18 de 21 casos en nuestra serie eran no mutados). Aunque parece que el usado VH1-69 es prácticamente exclusivo de los varones, en nuestro estudio no se apreciaron diferencias significativas respecto del sexo, aunque sí una tendencia a presentarse con más frecuencia en el sexo masculino (15 de los 21 casos).

Al igual que en otros estudios, los pacientes con mutaciones en VH4 (VH4-34 es la más frecuente) fueron, en su mayor parte, mutados y mujeres<sup>159</sup>. La afectación de otros usados fue excepcional. Sin embargo, cabe reseñar que, en el grupo de 226 enfermos a los que se realizó el estudio de mutaciones somáticas, 8 de ellos exhibían el usado VH5-51. Todos ellos eran varones y en 7/8 casos el patrón era no mutado. Estos resultados, no comunicados hasta el momento, deben tomarse con prudencia debido al escaso número de casos con alteraciones en el usado VH5 (< 5%) y confirmarse en estudios más amplios.

### 5.1.2.3. Análisis de la supervivencia global (SG)

El análisis univariante del estudio de la supervivencia puso de manifiesto, al igual que en otros estudios, el peor pronóstico del sexo masculino (141 meses *vs* 260 meses en mujeres)<sup>116</sup>, de los pacientes con LDH elevada (56 meses *vs* 159 meses en los enfermos con LDH normal) o con  $\beta_2$ microglobulina elevada (86 meses *vs* 152 meses)<sup>10</sup>, de los estadios clínicos avanzados (en la clasificación de Binet: estadio A, 218 meses *vs*

estadio B, 75 meses vs estadio C, 52 meses)<sup>9</sup>, de la infiltración difusa de la médula ósea (97 meses vs 242 meses)<sup>58</sup>, así como del hecho de presentar una prueba de la antiglobulina directa positiva (56 meses vs 159 meses), esplenomegalia o sintomatología constitucional. Todos ellos son factores pronósticos ampliamente estudiados en las últimas décadas, pero que aún, en algunos casos, se hallan plenamente vigentes hoy en día.

Nuestros resultados confirman los estudios previos<sup>15,20,88,187</sup>, si bien cabe recordar que en nuestra serie los pacientes no fueron seleccionados, lo que puede representar de forma más real lo que sucede en el curso de la enfermedad que los hallazgos obtenidos a partir de ensayos clínicos, en los que los criterios de inclusión y exclusión pueden llevar en sí mismo algunos sesgos (de selección fundamentalmente) que pueden condicionar, en parte, algunos resultados<sup>75</sup>.

Respecto a la relación entre las alteraciones citogenéticas determinadas por FISH y la supervivencia global, nuestros resultados son similares a los referidos<sup>12,15,88,261</sup>. Así, los pacientes con pérdida en 17p presentaron un pronóstico peor (50 meses vs 32 meses en el estudio alemán), seguidos de los que tenían pérdida en 11q (74 meses vs 79 meses en la citada serie) y trisomía del cromosoma 12 (98 meses vs 114 meses). Los pacientes con 13q- considerados globalmente tuvieron una supervivencia similar en ambas series (159 meses en nuestra serie vs 133 meses). Por el contrario, en el estudio alemán, los pacientes con citogenética normal presentaron una supervivencia inferior (111 meses) que los casos con 13q- (133 meses), mientras que en nuestra serie la mediana de supervivencia no se había alcanzado<sup>15</sup>. En este sentido, estos resultados se aproximan más al estudio de Damle *et al*<sup>12</sup>, con lo que se deberían incluir a ambos grupos de enfermos, con pérdida en 13q o sin alteraciones citogenéticas, en el grupo de pronóstico favorable. Se desconoce el motivo por el que los pacientes con alteraciones en 13q14

tienen un mejor pronóstico respecto al resto de enfermos con otras alteraciones citogenéticas. En los casos con delección de 13q14 monoalélica una posible explicación del buen pronóstico asociado con la pérdida de 13q sería que los genes relacionados con esta delección no serían favorecedores de eventos en la progresión de la enfermedad<sup>262,263</sup>. Recientemente, se han descrito la presencia de dos miRNAs (miRNA-15a y miRNA-16-1) en 13q14<sup>214</sup>. Su pérdida en células con LLC-B puede predisponer a mutaciones adicionales que afectan a oncogenes claves, como por ejemplo *TCL1A* vía *MIRN29*<sup>264</sup>.

En lo referente a los casos con t(14q32) el número escaso de pacientes conjuntamente con el poco seguimiento, hacen que los resultados no fueran valorables. Por ello se realizó un estudio cooperativo con diversos hospitales italianos (ver apartado 5.2., página 98). Cabe reseñar que los enfermos con alteraciones citogenéticas múltiples presentaron peor pronóstico (Tabla 13), si bien las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

Los enfermos con patrón no mutado tuvieron una supervivencia inferior (117 meses vs 215 meses). Los pacientes con mutaciones en el segmento VH3 presentaron estado mutado con más frecuencia, incluyendo los VH3-21, un subgrupo más frecuente en los países del norte que en el sur de Europa<sup>260</sup> y, que, aunque presentan habitualmente patrón mutado, tienen un especial mal pronóstico<sup>158</sup>. En nuestra serie, únicamente 7 de los 226 pacientes a los que se realizaron mutaciones somáticas tenían este segmento mutacional, de los que 6 eran mutados. No se apreciaron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia global ni en el tiempo hasta la progresión en este subgrupo de pacientes (datos no mostrados).

Los enfermos con mutaciones en VH1 tenían un peor pronóstico, ya que la mayoría de los mismos mostraron el usado VH1-69 (18 de 21 casos en nuestra serie eran no

mutados). Estos resultados son similares a los descritos previamente, aunque nuestro grupo no ha confirmado el resultado de otros que indican que es prácticamente exclusivo del sexo masculino<sup>160</sup>.

Un 25% de los pacientes presentaban positividad para CD38 si el punto de corte era > 30% y 44% si era > 7%. No se produjeron diferencias reseñables en cuanto a la supervivencia ni en cuanto al tiempo hasta la progresión según el punto de corte utilizado<sup>132,188</sup>.

En este estudio no se incluyó la determinación del valor pronóstico del ZAP-70 (realizado mediante inmunofenotipo de sangre periférica), porque únicamente se realizó en 77 de los 350 pacientes (lógicamente en los enfermos con menor seguimiento), lo que impidió extraer conclusiones acerca del valor pronóstico de este marcador inmunofenotípico, generalizado en los últimos 4-5 años<sup>13,265</sup>.

El análisis multivariante de la SG puso de manifiesto que las dos variables incluidas en el modelo en la serie global fueron presentar pérdida en 17p y la cifra elevada de la LDH. Estas dos variables tradicionalmente han entrado a formar parte de las más importantes en las diferentes series publicadas<sup>114,171,177</sup>. De hecho, los pacientes de la serie con 17p- presentaban 7 veces más de riesgo de fallecer que los que no tenían dicha alteración. Otros factores genéticos ominosos fueron la pérdida de 11q, con 2,5 veces más de riesgo y la expresión del segmento VH1-69, con 2,6 veces más riesgo de morir que los pacientes que no exhibían dicho usado. Por el contrario, el cariotipo normal, la delección de 13q como única alteración y el patrón mutado fueron factores protectores. La mayoría de los estudios habían determinado que la presencia de pérdidas en 13q y de mutaciones somáticas son un factor pronóstico favorable en las LLC<sup>15,189</sup>. Sin embargo, la presencia de un cariotipo sin alteraciones no se había considerado previamente como de mejor pronóstico que la pérdida de 13q.

#### 5.1.2.4. Análisis del tiempo hasta la progresión (TPT)

Uno de los factores pronósticos que se analizan en las enfermedades con un curso clínico prolongado es el tiempo que media hasta el inicio del tratamiento. Este parámetro constituye un signo indirecto de la agresividad de la enfermedad y complementa a la supervivencia global.

Respecto a los factores pronósticos clásicos, el sexo y la edad no parecen influir a la hora de recibir el tratamiento, aunque sí las cifras elevadas de la LDH o de la  $\beta_2$ microglobulina, la hepatoesplenomegalia, el patrón difuso de la médula ósea y el estadio clínico avanzado, resultados semejantes a los publicados previamente<sup>115</sup>.

Al igual que ocurre al analizar la supervivencia global, en el estudio de los factores genéticos que se relacionan con el intervalo hasta el primer tratamiento, nuestros resultados son similares a los obtenidos por el grupo alemán. Así, los pacientes con pérdida en 17p y en 11q presentaron un tiempo hasta el tratamiento más corto (12 y 10 meses, respectivamente *vs* 9 y 13 meses en la serie alemana), seguidos por los que tenían trisomía del cromosoma 12 (28 meses *vs* 30 meses) y delección de 13q (71 meses *vs* 92 meses)<sup>15</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio, los casos con FISH normal tuvieron un intervalo libre de tratamiento superior al referido por el grupo alemán (107 meses *vs* 42 meses). Por tanto, se confirman los resultados obtenidos en cuanto a la supervivencia, en el sentido de que los pacientes con 13q- y citogenética normal por FISH constituyen un grupo con mejor pronóstico.

Los enfermos no mutados precisaron tratamiento a los 2,5 años, mientras que en los mutados la administración del mismo sólo fue precisa superados los 15 años de seguimiento. Estos resultados son semejantes a los publicados previamente<sup>65,189</sup>. Los pacientes con usado VH1-69 se trataron a los 2 años mientras que en los que no presentan este usado el tratamiento se inició pasados los 5 años. Además, los enfermos

con mutaciones en VH4 eran, en su mayor parte, mutados, mujeres y progresaron menos que los que no mostraban este usado. Por otra parte, los enfermos con VH5-51 constituyen un grupo de especial mal pronóstico, ya que precisaron tratamiento antes del año del diagnóstico respecto a los 54 meses de los que no presentan dicho patrón mutacional, resultados no referidos en nuestro conocimiento hasta ahora.

Respecto al análisis multivariante, al igual que en diversas series<sup>15,114</sup>, las deleciones de 11q, 17p, el estado de IgV<sub>H</sub> no mutado, el estadio avanzado de Binet y la  $\beta_2$ microglobulina elevada constituyeron las variables incluidas en el modelo final respecto al tiempo hasta la instauración del primer tratamiento.

Para finalizar, cabe reseñar que el hecho de tener un puntuación diferente en el *score* propuesto por Matutes et al<sup>67</sup> no se relacionó ni con la SG ni con el TPT.

En conclusión, la serie de 350 pacientes con LLC analizados por FISH reproduce en sus puntos fundamentales lo ya referido en la literatura. Cabe destacar que el uso de las alteraciones genéticas (ganancias y pérdidas de material genético y mutaciones somáticas) modificó sustancialmente los factores pronósticos que influyen en las LLC tanto a nivel de la supervivencia global como del tiempo hasta el primer tratamiento tal y como se ha demostrado en otras series<sup>12,15,65,189,266</sup>.

El relativo mejor curso de los pacientes con citogenética normal hizo que se plantease la hipótesis de que, quizás, los pacientes con deleción de 13q14 pudieran presentar un comportamiento diferente según el número de células con pérdidas en 13q, tal como ya se ha demostrado en los pacientes con mutaciones en *TP53* por parte del grupo inglés<sup>88</sup> (González D, comunicación personal). Además, el pequeño número de pacientes y, sobre todo, el escaso seguimiento de los pacientes con t(14q32) nos animó a realizar un estudio de este subgrupo de pacientes en una serie más amplia. Estos dos aspectos, junto

con el análisis de rutas específicas en la LLC, constituyen los siguientes capítulos del presente trabajo.

## **5.2. Los pacientes con LLC-B y alteraciones en 14q32/*IGH* presentan un curso clínico desfavorable (Anexo 1)**

Como se ha indicado previamente, se realizó un estudio más exhaustivo de los pacientes con alteraciones en 14q32/*IGH*, con la intención de demostrar si este subgrupo presentaba alguna característica diferencial respecto a otros enfermos con LLC-B. Para ello se incluyeron 252 pacientes (105 enfermos de nuestra serie y 147 de otros tres grupos italianos procedentes de los Hospitales de Ferrara, Siena y Módena), todos ellos diagnosticados a partir de 2001. Las principales características de la serie se han reflejado en la Tabla 9 (“Pacientes y Métodos”, página 46).

### 5.2.1. Resultados

#### **5.2.1.1. Estudios citogenéticos y características hematológicas**

El estudio de FISH permitió dividir a los enfermos en varias categorías. Cerca de la mitad de ellos (n = 110; 43,6%) se asignaron al grupo de riesgo favorable (13q- o citogenética normal), 99 al de riesgo intermedio (trisomía 12, 6q- ó 1-2 alteraciones citogenéticas), 25 al de riesgo desfavorable (11q-, 17p- o cariotipo complejo), mientras que los 18 restantes pertenecían al grupo con la traslocación 14q32/*IGH*. Dos pacientes con reordenamiento 14q32/*IGH* se incluyeron en el grupo de riesgo desfavorable porque tenían 3 ó más alteraciones citogenéticas en el cariotipo. En un enfermo del grupo con la traslocación 14q32/*IGH* se observó la presencia de una delección de 17p en el momento de la recaída de la LLC. En nuestra serie, no se evidenciaron traslocaciones 14q32/*IGH* como evento secundario en el transcurso de la enfermedad.

Las Tablas 16 y 17 reflejan las principales características hematológicas de los pacientes de la serie.

**Tabla 16. Características clínicas y biológicas al diagnóstico de los 252 pacientes pertenecientes a hospitales españoles e italianos**

Variable	
<b>Grupo de riesgo citogenético*</b>	
1	110
2	99
3	25
4	18
<b>Tratamiento</b>	
Sí	90
No	162
<b>Vivo</b>	
Sí	231
No	21
<b>Mediana de seguimiento</b>	24 meses
<b>Supervivencia global 25 %</b>	51 meses
<b>Tiempo hasta el primer tratamiento 25 %</b>	12 meses
<b>Estado mutacional IgV<sub>H</sub>**</b>	
Mutado	60
No mutado	64

\*Grupo 1 ó favorable: delección 13q como única alteración o citogenética normal. Grupo 2 ó intermedio: trisomía 12, delección 6q ó 1-2 alteraciones citogenéticas en el cariotipo. Grupo 3 ó desfavorable: delección 11q, delección 17p ó cariotipo complejo. Grupo 4: traslocación 14q32/IGH. \*\* Realizado en 104 pacientes.

**Tabla 17. Características clínicas y hematológicas según los diferentes grupos citogenéticos (1: favorable; 2: intermedio; 3: desfavorable y 4: traslocación 14q32/IGH) de la serie de 252 pacientes españoles e italianos**

Variable	Grupo 1 (n=110)	Grupo 2 (n=99)	Grupo 3 (n=25)	Grupo 4 (n=18)	Valor de P
<b>Edad media, años (±de)</b>	65,3 (11,2)	65,7 (12,1)	63,4 (11,9)	63,3 (12,4)	ns
<b>Sexo</b>					
M/F	74/36	70/29	21/4	12/6	ns
<b>Leucocitos (x 10<sup>9</sup>/l)</b>	27,8 (25,7)	27,7 (33,7)	50,5 (75,4)	28,6 (18,8)	0,03
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	14,1 (1,7)	13,8 (2,3)	13,5 (2,1)	13,4 (1,4)	ns
<b>Plaquetas (x 10<sup>9</sup>/l)</b>	207 (74)	193 (67)	195 (78)	167 (47)	ns
<b>Estadio de Rai</b>					
0-2	102	93	22	17	ns
3-4	8	6	3	1	
<b>CD38</b>					
Negativo	77	56	6 *(p= 0,016)	11	<0,001
Positivo	33	43	19	7	
<b>Tratados</b>					
Sí	29 *(p=0,016)	32	19	10	0,001
No	81	67	6	8	
<b>Vivos</b>					
Sí	107 *(p=0,001)	93 *(p=0,013)	18	13	<0,001
No	3	6	7	5	
<b>IgV<sub>H</sub></b>					
mutado	30	21	3	6	0,009
no mutado	19	21	16	8	

\*Los valores de P se expresan entre paréntesis en los parámetros que presentan diferencias estadísticamente significativas cuando se compara el grupo 4 frente al grupo 1, el grupo 4 frente al grupo 2 y el grupo 4 frente al grupo 3.

Al efectuar el estudio de FISH, el porcentaje de positividad para la traslocación 14q32/IGH en los 18 pacientes pertenecientes al grupo 4 se situó entre el 20% y el 99% de las células (mediana 70%; Tabla 18). La traslocación 14q32/IGH fue la única

alteración detectada en 8 pacientes; de los restantes 10 enfermos, en 9 de ellos se observó una pérdida asociada en 13q14 y en un caso una trisomía del cromosoma 12. De los pacientes con traslocación 14q32/*IGH*, se identificó el cromosoma con el que se reordenaba *IGH* en 8 casos; de ellos, en 5 había un reordenamiento *BCL2/IGH*, y en un paciente en cada uno de los casos se detectaron fusiones de *IGH* con *BCL11A* (2p12), con *CCND3* (6p21) y con *CDK6* (7q21). En todos los casos se descartó que los pacientes presentaran un linfoma de células del manto en fase leucémica (se excluyeron los enfermos con fusión *BCL1/IGH*), leucemia prolinfocítica o linfoma linfoplasmocitoide.

**Tabla 18. Características citogenéticas moleculares e inmunofenóticas en los 18 pacientes con LLC y reordenamiento 14q32/*IgH***

Paciente*	FISH, % de células con alteraciones	Cariotipo [N° de células]	Familia IGVH (% mutaciones)	Inmunofenotipo (**)
	<i>IgH</i> R (gen traslocado)	Alteraciones adicionales (%)		
1	70 ( <i>BCL11A</i> )	No	46,XY,t(2;14)(p12;q32), del(19)(q12) [10] / 46,XY [6]	<i>VH4-39</i> (0%) 5
2	79 ( <i>BCL2</i> )	13q- (72%)	46,XY,t(14;18)(q32;q21) [4] / 46,XY [18]	NR 5
3	75 ( <i>BCL2</i> )	13q- (70%)	46,XY, t(14;18)(q32;q21) [4] / 46,XY [21]	<i>VH4-31</i> (8%) 4 (sIg++)
4* ****	78 ( <i>CCND3</i> )	No	46,XY,t(6;14)(p12;q32) [8] / 46,XY [12]	<i>VH3-7</i> (8,8%) 3 (sIg++; FMC7+)
5	90	13q- (26%)	46,XX,add(14)(q32),add(16)(q13) [5] / 46,XX [7]	<i>VH4-39</i> (0,4%) 4 (CD23-)
6*	99	No	46,XY,add(14)(q32) [6] / 46,XY [14]	<i>VH5-51</i> (4%) 5
7	20	No	46,XX [20]	<i>VH1-02</i> (0%) 5
8	70	No	47,XY,+18 [2] / 46,XY [15]	NR 5
9	46 ( <i>BCL2</i> )	13q- (14%)	46,XY,t(14;18)(q32;q21) [8] / 46,XY [12]	NR 5
10	85	No	46,XX [20]	<i>VH4-59</i> (14%) 5
11	87,5 ( <i>BCL2</i> )	No	46,XY,t(14;18)(q32;q21) [3] / 46,XY [20]	<i>VH1-18</i> (8,9%) 4 (sIg++)
12	68,5	13q- (67%)	No mitosis	<i>VH4-34</i> (0%) 5
13	86 ( <i>BCL2</i> )	13q- (77%)	46,XY [20]	<i>VH1-69</i> (0%) 5
14	75	+12 (69%)	47,XY,+12 [10] / 46,XY [10]	<i>VH3-11</i> (0,46%) 4 (sIg++)
15	61	13q- (57%)	No mitosis	<i>VH3-72</i> (13,9%) 5
16	29,5	13q- (28)	46,XX [12]	<i>VH4-34</i> (0%) 4 (sIg++)
17	56	13q- (53%)	46,XX [14]	<i>VH1-46</i> (0%) 4 ***
18	32 ( <i>CDK6</i> )	No	No mitosis	NR 4 ***

\* Morfología atípica según los criterios de la FAB<sup>26/</sup> \*\* Score 5 según los criterios de Matutes *et al*<sup>6/</sup> definidos por CD19/CD5+, CD23+, CD22 débil+, sIg débil+ y FMC7 negativo; entre paréntesis se indica la existencia de diferencias respecto al fenotipo esperado.\*\*\* FMC7 no realizado.\*\*\*\* adquisición de la delección de 17p- como alteración adicional durante el seguimiento. NR: no realizado.

Los datos relativos al estado mutacional de IgV<sub>H</sub> detectados en el grupo 4 están detallados en la Tabla 18. Como se refleja en la Tabla 17, la frecuencia de estados no mutados (que supusieron el 51,6% del total) difirió significativamente según los grupos citogenéticos propuestos.

#### **5.2.1.2. Correlación entre las características citogenéticas, los parámetros clínicos y biológicos y el pronóstico**

La mediana de seguimiento de los 252 pacientes fue de 24 meses. Durante el periodo de estudio, 90 enfermos precisaron tratamiento y 21 fallecieron. En el grupo con reordenamiento de 14q32 (gen *IGH*), cinco pacientes murieron por progresión de la LLC (4 casos, uno de ellos por síndrome de Richter) o infección (un paciente). Los parámetros hematológicos en el momento del diagnóstico no difirieron significativamente según el grupo citogenético (Tabla 17), con la excepción de una frecuencia más alta de positividad en el CD38 en los pacientes con citogenética desfavorable ( $p < 0,001$ ) y mayor linfocitosis ( $p = 0,03$ ). Además este grupo tenía mayor número de casos no mutados ( $p = 0,009$ ). Como se detalla en la Tabla 19, en el grupo 4 (pacientes con traslocación 14q32/*IGH*) se observó una reducción significativa del tiempo hasta el primer tratamiento (TPT) y de la supervivencia global (SG).

En la Figura 16 se muestran las curvas del TPT y de la SG en los diferentes grupos citogenéticos. Como se detalla en la Tabla 19, en el grupo 4 (pacientes con traslocación 14q32/*IGH*) se observó una reducción significativa del TPT y de la SG.

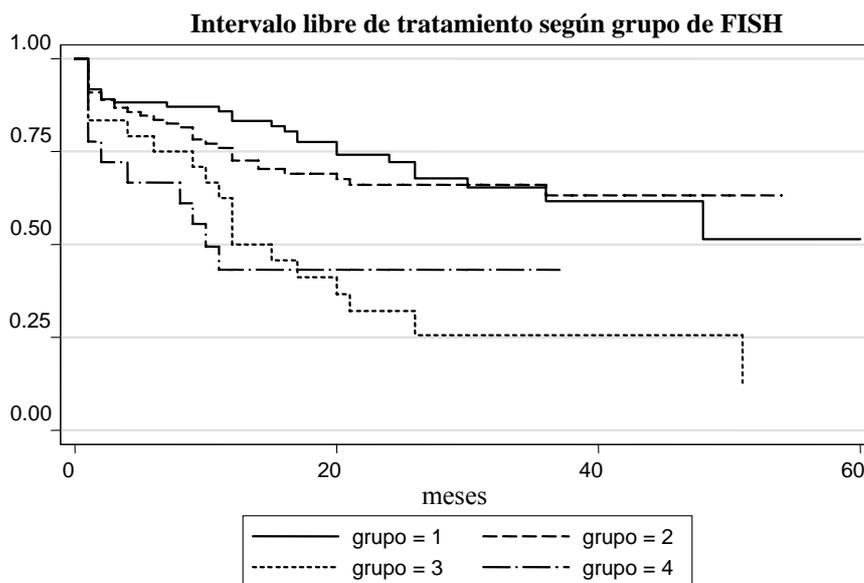
**Tabla 19. Factores con influencia en el tiempo hasta el primer tratamiento (TPT) y en la supervivencia global (SG) de la muestra de 252 pacientes de hospitales españoles e italianos con LLC (\*)**

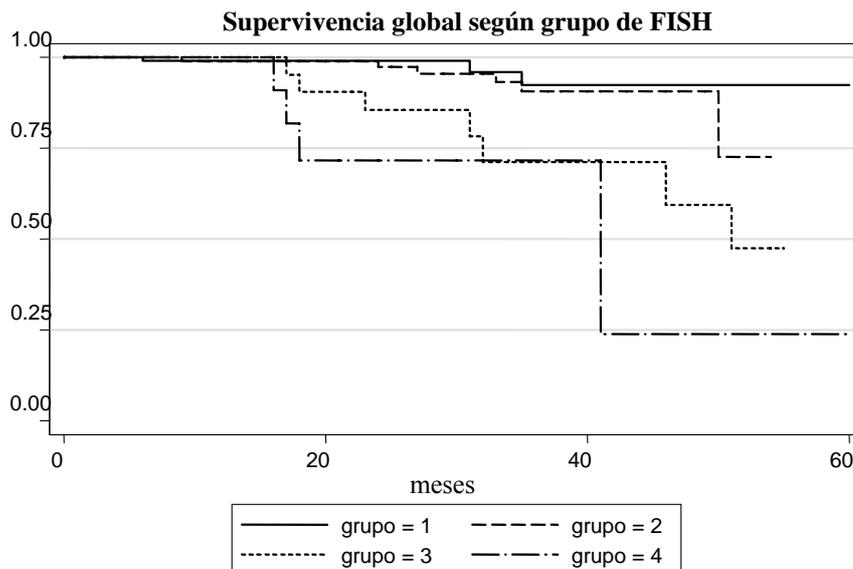
TPT	Nº de pacientes	Meses (25% tratados)	Valor de P
Estadio de Rai			
0-2	238	15	< 0,0001
3-4	18	1	
CD38			
positivo	102	9	0,0001
negativo	150	20	
Grupos citogenéticos			
Favorable	110	20 *(p=0,0022)	0,0001
Intermedio	99	12 *(p=0,0229)	
Desfavorable	25	9	
14q32/IgH	18	2	

SG	Nº de pacientes	Meses (25% tratados)	Valor de P
Estadio de Rai			
0-2	238	51	0,0065
3-4	18	31	
Grupos citogenéticos			
Favorable	110	No alcanzada a 60 meses *(p<0,0001)	<0,0001
Intermedio	99	50 *(p=0,0003)	
Desfavorable	25	32	
14q32/IgH	18	18	

\*Los valores de P se expresan entre paréntesis en los parámetros que presentan diferencias estadísticamente significativas cuando se compara el grupo 4 frente al grupo 1, el grupo 4 frente al grupo 2 y el grupo 4 frente al grupo 3.

**Figura 16. Intervalo entre el diagnóstico y el tratamiento y supervivencia global por grupos citogenéticos en los 252 pacientes de la serie\***





\*Grupo 1: Pronóstico favorable. Grupo 2: Pronóstico intermedio. Grupo 3: Pronóstico desfavorable. Grupo 4: t14q32/IGH.

En el análisis univariante, los 18 pacientes con traslocación 14q32/IGH se asociaron con un TPT 25% más corto (2 meses vs 12 meses,  $p = 0,0125$ ) y una SG 25% igualmente inferior (18 meses vs 51 meses,  $p = 0,0001$ ).

Como se observa en la Tabla 20, los 4 grupos citogenéticos mantuvieron su significación pronóstica en cuanto al TPT y la SG en el análisis multivariante. Si embargo, mientras que en el TPT influían también el estadio clínico avanzado y la positividad del CD38, en cuanto a la SG, únicamente lo fueron el estadio clínico avanzado y los grupos citogenéticos incluyendo como un grupo individualizado la presencia de reordenamientos de 14q32/IGH (Tabla 20b).

**Tabla 20. Resultados del análisis multivariante.**

**Tabla 20a. Tiempo hasta el primer tratamiento (TPT)**

Variable	Tasa de Riesgo (Hazard Ratio)	Error estándar	Valor de P
Estadio de Rai	5,64	1,70	<0,001
CD38	1,78	0,40	0,01
Grupos citogenéticos	1,39	0,16	0,003
Favorable			
Intermedio			
Desfavorable			
14q32/IgH			

Tabla 20b. Supervivencia global (SG)

Variable	Tasa de Riesgo (Hazard Ratio)	Error estándar	Valor de P
Estadio de Rai	3,70	1,91	0,011
Grupos citogenéticos Favorable Intermedio Desfavorable 14q32/IgH	2,54	0,59	<0,001

La presencia de alteraciones cromosómicas adicionales, como se detectó por FISH en 10 de los 18 pacientes del grupo 4, no influyó ni en el TPT ( $p = 0,96$ ) ni en la SG ( $p = 0,84$ ) respecto a los casos en los que el reordenamiento 14q32/*IGH* fue la única alteración observada. Tampoco hubo diferencias en lo referente al TPT cuando se compararon los 5 pacientes en los que el gen traslocado con *IGH* fue *BCL2* respecto a los 13 enfermos restantes. El TPT en los 14 pacientes evaluables según la existencia de patrón mutado (11 meses) o no mutado (9 meses) no presentó diferencias significativas ( $p = 0,81$ ). Debido al escaso número de eventos, no se pudo realizar el mismo análisis en lo relativo a la SG.

### 5.2.2. Discusión

La segunda parte de este trabajo doctoral se centró en el análisis de los pacientes con LLC y reordenamiento de *IGH*. Para ello se estudió una muestra de 252 pacientes con LLC pertenecientes a diversos hospitales españoles e italianos, con la intención de analizar el comportamiento de los pacientes con LLC-B y t(14q32), una alteración citogenética que, a pesar de presentarse en alrededor del 5-8% de las LLC, no se ha caracterizado desde el punto de vista citogenético ni pronóstico con la misma profundidad que las 4 anomalías citogenéticas “clásicas” (deleciones de 11q, 13q, 17p y trisomía del cromosoma 12).

En este estudio existen diversos aspectos metodológicos que proporcionan mayor validez al mismo. Entre ellos destaca el rigor en el diagnóstico de la LLC y la homogeneidad del seguimiento (todos los pacientes se hallaban diagnosticados entre 2001 y 2006) y, por consiguiente, de los tratamientos aplicados. Con la finalidad de asegurar la validez diagnóstica, el estudio incluyó únicamente a los pacientes con morfología e inmunofenotipo de LLC según los criterios de la clasificación FAB<sup>268</sup> y excluyó todos los casos con t(11;14) (a pesar de que, probablemente, existen LLC atípicas con esta alteración genética)<sup>269</sup> y los casos con sospecha de leucemización de un linfoma no hodgkiniano (LNH). Probablemente, debido a estos criterios tan estrictos, en ninguno de los pacientes se observó la t(14;19) que afecta al gen *BCL3*, una alteración genética que muestra características de LNH con expresión hemoperiférica en algunos casos<sup>270</sup>. Otro aspecto que ratifica la homogeneidad de la muestra es que no se observaron diferencias en lo referente a la supervivencia global (SG) y al tiempo hasta el tratamiento (TPT) entre los hospitales incluidos en el estudio (datos no mostrados).

En el estudio se comparó el grupo de pacientes con traslocación 14q32 con los diferentes grupos citogenéticos previamente descritos. Los pacientes con t(14q32) (grupo 4) presentaron peor SG y TPT que los grupos 1 (pronóstico favorable, pérdida de 13q) y 2 (pronóstico intermedio, FISH normal). Cabe resaltar que no se observaron diferencias entre los enfermos con LLC con pronóstico desfavorable, que incluyó a los pacientes con del 11q y/o del 17p, y el grupo de reordenamientos de *IGH* en términos de TPT (TPT 25 % de 9 y 2 meses, respectivamente;  $p = 0,98$ ) y de SG (SG 25 % de 32 y 18 meses, respectivamente;  $p = 0,22$ ).

En nuestra serie, la traslocación 14q32/*IGH* se produjo en el 7,1% de los pacientes, lo que confirma la incidencia de esta alteración en estudios previos<sup>15,261,271</sup> y se puso de manifiesto en la mayoría de las células (mediana de 70 %). Las únicas alteraciones

concomitantes detectadas mediante FISH fueron las pérdidas de 13q14 y la trisomía del cromosoma 12, aunque en ningún caso los reordenamientos de *IGH* se asociaron con las pérdidas en 11q21 ni en 17p13.

En 5 de los 18 casos (27,7 %) se observó la traslocación de 14q32/*IGH* con *BCL2* y en un caso con 2p12/*BCL11A*, 6p21/*CCND3* y 7q21/*CDK6*. Sin embargo, en 10 de los 18 casos restantes no se identificó el cromosoma al que se traslocaba el gen *IGH*. El gen de fusión *IGH/BCL2*, citogenéticamente indistinguible del que se observa en la mayoría de los linfomas foliculares, se ha documentado en la LLC. Los casos con el gen de fusión *IGH/BCL2* presentaban características clínicas típicas de LLC, con pocas adenopatías y, en todos los casos, la morfología era típica de LLC<sup>67</sup>, con ausencia del marcador CD10, normalmente expresado en los linfomas foliculares. Todos ellos tenían puntuaciones superiores a 3 lo que refrenda el diagnóstico de LLC (Tabla 18). En la LLC es habitual no encontrar los cromosomas con los se trasloca *IGH*<sup>271</sup> y, tanto *BCL11A* como *CCND3* y *CDK6* se han descrito ocasionalmente como localizaciones ocasionales de la traslocación. La traslocación t(2;14) (p13;q32), que afecta al gen *BCL11A* se ha descrito en algunos pacientes jóvenes con LLC agresiva<sup>272</sup> y en LNH con expresión hemoperiférica<sup>273</sup>. Küppers *et al* comunicaron un caso de un paciente con LLC con t(6;14), que afectaba a *CCND3* y en asociación con una clásica t(14;19)<sup>274</sup>. Sin embargo, la t(6;14) es más frecuente en el mieloma múltiple y en linfomas leucemizados<sup>275,276</sup>. En el caso de nuestra serie, la biopsia de médula ósea evidenció la existencia de un patrón de infiltración mixto típico de LLC<sup>58</sup> y ausencia del patrón intrasinusoidal característico de los LNH de la zona marginal<sup>277</sup>. Por último, el enfermo con fusión *IGH/CDK6* tenía las características de una LLC típica<sup>117</sup>. En 2003 se describieron 3 casos de LLC con este gen de fusión, uno de los cuales tuvo una supervivencia muy corta<sup>278</sup>.

A pesar del empleo de un amplio panel de sondas de FISH dirigidas al estudio de las regiones que con mayor frecuencia se afectan en las traslocaciones recíprocas que afectan a los *loci* de las Igs, en 10 de los 18 casos no se pudieron identificar los cromosomas con los que se traslocaba *IGH*. Como recientemente se ha publicado, la aplicación de las nuevas técnicas de cultivo cromosómico tras el uso de oligonucleótidos como estimuladores de la división celular, quizás permita un mejor reconocimiento de estas alteraciones citogenéticas en la LLC<sup>199</sup>. La presencia del reordenamiento de *BCL2* no supuso diferencias en términos de SG ni de TPT con respecto al resto de los casos con traslocación 14q32/*IGH*. Además, las alteraciones cromosómicas adicionales no tuvieron influencia en el curso clínico de estos pacientes.

Mientras que determinadas alteraciones citogenéticas se asocian con características hematológicas peculiares (por ejemplo, los pacientes con pérdida de 11q suelen presentar adenopatías voluminosas, los que tienen trisomía 12 o deleción de 6q características de LLC atípica, o los que que tienen pérdida de 17p ausencia de respuesta al tratamiento con fludarabina), los pacientes con traslocación 14q32/*IGH* no presentaron características diferenciales en nuestro estudio<sup>168,169,171,279</sup>. Estos resultados no confirman los publicados hace más de 20 años por el grupo inglés, que observaron que los casos con LLC y 14q+ presentaban mayor transformación prolinfocitoide o a síndrome de Richter, linfocitosis marcada, refractariedad al tratamiento y estadios clínicos avanzados<sup>172</sup>. Es probable que algunos de los casos incluidos en dicho estudio representaran realmente casos de LNH leucemizados, probablemente linfomas de células del manto.

En nuestro conocimiento, es la primera vez que se comunica que los pacientes con LLC y traslocación 14q32/*IGH* tienen peor SG y TPT que los que tienen citogenéticas de pronóstico favorable o intermedio. Este hecho no debe resultar extraño, ya que la

presencia del cromosoma 14q+ fue un factor independiente de acortamiento de la supervivencia en un estudio con un número extenso de casos estudiado mediante técnicas citogenéticas convencionales<sup>280</sup> y que la traslocación de *IGH* se asoció con una supervivencia libre de progresión corta (11 meses) tras la administración de tratamiento con fludarabina en una serie recientemente publicada<sup>179</sup>. Por último, debe destacarse que la incidencia de patrones no mutados y la positividad para CD38 fue similar en los grupos de pronóstico favorable, intermedio y en el de la traslocación 14q32/*IGH*, lo que haría de esta alteración citogenética un factor con valor pronóstico propio. Por consiguiente, el estudio de la t(14q32) es necesario en los pacientes con LLC y se debe incorporar a los paneles de análisis por FISH.

### **5.3. Los pacientes con LLC con un número alto de pérdidas en 13q presentan un curso clínico peor y características biológicas específicas (Anexo 2)**

#### 5.3.1. Resultados

Como se ha puesto de manifiesto a lo largo del presente trabajo de tesis doctoral, en los pacientes con LLC las alteraciones citogenéticas se correlacionan significativamente con el pronóstico. Clásicamente, se ha considerado que los enfermos con deleción en 13q14 tienen un curso clínico mejor, mientras que los pacientes con deleciones en 11q23 y 17p13 tienen una supervivencia y tiempo hasta la progresión más cortos y los casos con cariotipo normal y trisomía del cromosoma 12 se consideran de pronóstico intermedio. Sin embargo, en algunas series con un seguimiento prolongado, los pacientes con LLC-B y cariotipo normal presentan una mejor supervivencia a partir de los 12-13 años del diagnóstico con respecto a los que tienen deleción en 13q14. De hecho, esta circunstancia se ha observado también en los enfermos de la serie de 350 pacientes, tal como se ha reflejado en la Figura 10.

Por estas razones, se efectuó un análisis de los pacientes con deleción de 13q14, considerada como única alteración citogenética, en la la serie global de 350 pacientes con LLC-B. Para ello, se analizaron las características clínicas y biológicas, mediante el análisis del perfil de expresión génica (PEG), de los pacientes con LLC-B que presentaban diferente infiltración por 13q-, para evaluar si el porcentaje de pérdidas en esta región puede influir en el pronóstico o en las características biológicas de la enfermedad.

Como ya se ha referido, en 282 de los 350 casos (80,6%), la FISH se realizó en el momento del diagnóstico. En la mayoría de los casos restantes, que correspondían a los casos con más seguimiento, el estudio de FISH fue normal o con alteraciones en 13q14. Un total de 162 pacientes (46,3%) presentaron delección en 13q14. En 128 de los casos (36,6%) fue la única alteración citogenética y en 109 enfermos (31,1%) la única alteración por FISH al diagnóstico. En el 21,4% de los pacientes se observó que la delección de 13q14 era homocigota (bialélica), mientras que el resto (78,6%) tenían la delección en forma heterocigota (monoalélica).

#### **5.3.1.1. Características clínicas y biológicas de los distintos subgrupos con delección en 13q14**

Las principales características de este grupo de enfermos están recogidas en la Tabla 21. La mediana de edad de los 109 pacientes con delección de 13q14 en el momento del diagnóstico fue de 65 años con predominio de varones (74; 67,9%). La mediana de seguimiento de la serie global fue de 42 meses (extremos: 6-248), con 31 pacientes con más de 72 meses de seguimiento. El 54,7% de los enfermos tenían una puntuación de 4 de acuerdo a la clasificación de Matutes *et al* mientras que en el resto de los casos (45,3%) era de 5<sup>67</sup>. Los enfermos presentaban linfocitosis moderada (mediana de  $14,0 \times 10^9/l$ ), con cifra de hemoglobina y de plaquetas normales. Únicamente, 6 de los 109 pacientes (5,6%) presentaron en el momento del diagnóstico niveles altos de la LDH sérica, mientras que la  $\beta_2$ microglobulina se hallaba elevada en más de un tercio de los 99 enfermos analizados. En el 6,4% y en el 13,8% de los casos se evidenció hepatomegalia y esplenomegalia, respectivamente. Sólo el 27,5% presentaban linfadenopatías en el momento del diagnóstico y únicamente manifestaron síntomas B el 5,5% de los enfermos. La biopsia de médula ósea (realizada en 85 pacientes) reveló la

existencia de un patrón difuso en el 21,2% de los casos. La mayoría de los enfermos pertenecían al estadio A, mientras que 11,9% estaban en estadio B y 6,4% en C. Según la clasificación de Rai, 71,5% eran estadio 0, 13,8% estadio 1, 7,3% estadio 2, 3,7 % estadio 3 y 3,7% estadio 4. Durante la evolución de la enfermedad, once pacientes presentaron duplicación linfocitaria y 35 (32,4 %) progresaron durante el seguimiento. Es importante reseñar que el 22% de los casos tenían patrón de IgV<sub>H</sub> no mutado y que el 29% de los pacientes presentaban CD38 positivo al diagnóstico (Tabla 21). Al finalizar el estudio, 76 enfermos (69,7%) no habían recibido aún tratamiento, mientras que a los 33 restantes se les había administrado, al menos, una línea de quimioterapia. Los tratamientos fueron heterogéneos y se basaron fundamentalmente en alquilantes (clorambucilo) en los pacientes mayores y en análogos de las purinas (fludarabina) en los más jóvenes. Durante el seguimiento fallecieron 7 pacientes (6,4%), 6 de ellos por progresión de la LLC y uno por toxicidad farmacológica. En esta cohorte de pacientes no se identificaron muertes por etiologías no relacionadas con la enfermedad.

**Tabla 21. Características de los 109 pacientes con delección de 13q14 como única alteración citogenética al diagnóstico de acuerdo con el porcentaje de pérdidas de FISH (< 80 (n = 91) o ≥ 80 (n = 18) %)**

Característica	Pérdida de FISH < 80, n° (%)	Pérdida de FISH ≥ 80, n° (%)	Valor de P
Edad, años	66 (38-90)	69 (44-86)	0,58
Leucocitos, extremos /μl	19.400 (7.600-133.510)	26.900 (15.000-125.000)	0,008
Linfocitos, extremos /μl	14.000 (3.600-129.500)	19.700(11.300-119.000)	0,007
Hemoglobina, extremos g/dl	14,4 (9-17,5)	14 (11-17,1)	0,91
Plaquetas, extremos /μl	183.000 (80.000-399.000)	182.000 (78.000-309.000)	0,44
Estado mutacional#			
Mutado	40	11	0,17
No mutado	14	1	
Del 13q14 bialélica / monoalélica*	16/69	4/13	0,43
CD38 <sup>±</sup>			
+	16	1	0,185
-	33	8	
Sexo			
Varón	61	13	0,49
Mujer	30	5	
Linfocitos			
< 30000/μl	80	11	0,011
≥ 30000/μl	11	7	
LDH			
Normal	83	18	0,32
Alta	7	1	
β <sub>2</sub> microglobulina			

Normal	56	9	0,21
Alta	28	8	
Estadio Binet			
A	76	13	
B	9	4	0,48
C	6	1	
Patrón infiltración médula ósea			
Difuso	12	6	0,07
Otro	58	9	
Hepatomegalia			
Sí	5	2	0,33
No	86	16	
Esplenomegalia			
Sí	10	5	0,07
No	81	13	
Síntomas B			
Sí	5	1	0,67
No	86	17	
Muertes durante el seguimiento			
Sí	3	4	0,01
No	88	14	
Tratamiento durante el seguimiento			
Sí	26	7	0,27
No	65	11	

#Realizado en 66 pacientes. \*Analizado en 102 casos. ðRealizado en 58 pacientes.

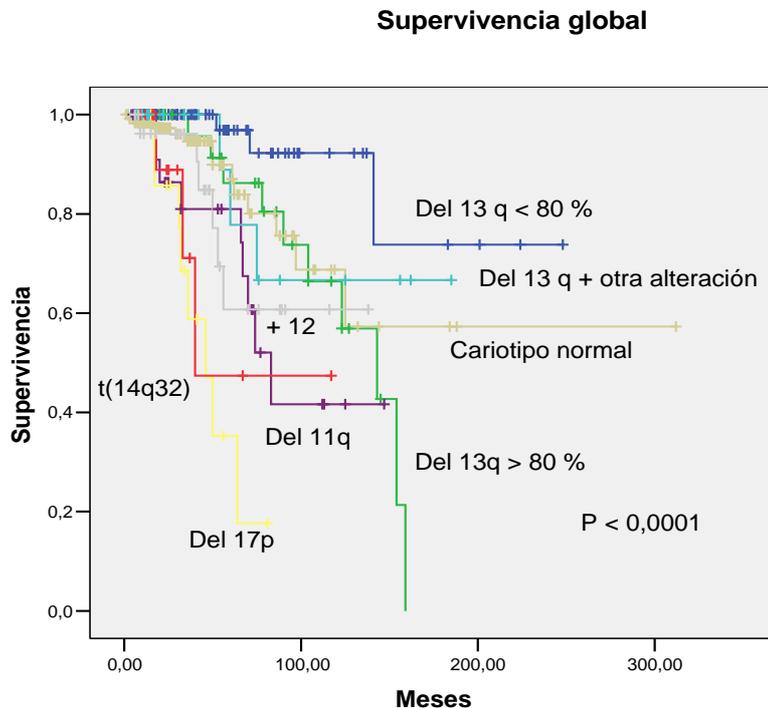
Como puede observarse, la mayoría de los pacientes (83,5%) presentaban la delección del cromosoma 13q14 en menos del 80 % de las células analizadas. No se evidenciaron diferencias clínicas, biológicas, inmunofenotípicas ni en cuanto al estado mutacional en ambos grupos, salvo que los enfermos con menos infiltración (< 80%) presentaban un recuento linfocitario significativamente más bajo ( $p = 0,011$ ). Aún así, entre los pacientes con un mayor número de pérdidas en 13q se observó una mayor tendencia a tener esplenomegalia e infiltración difusa de la médula ósea ( $p = 0,07$  para ambas variables).

### 5.3.1.2. Análisis global de la supervivencia y del tiempo hasta la progresión

Las curvas de la supervivencia global (SG) y del tiempo hasta el primer tratamiento (TPT) de la serie global de 350 pacientes de acuerdo a las alteraciones citogenéticas se han reflejado en las Figuras 10 y 14. Los enfermos con pérdida de 13q o con cariotipo normal presentaron la SG más prolongada (mediana de 159 meses y no alcanzada,

respectivamente). Este hecho se repitió en lo referente al TPT (mediana de 72 meses y 107 meses, respectivamente). Tal como se ha comprobado en otras series, en la SG se observó un cruce de ambas curvas a los 13 años del diagnóstico a favor de los pacientes con citogenética normal (Figura 10). En cuanto al TPT también se observó el entrecruzamiento a favor de los pacientes con cariotipo normal (Figura 14). En la Figura 17 se observa que, considerados globalmente (es decir los casos con delección en 13q14 realizados tanto al diagnóstico como en la evolución del mismo), los pacientes con infiltración inferior a 80% de células 13q- tenían una supervivencia más prolongada (mediana no alcanzada). Por el contrario, en los enfermos con infiltración elevada por células con 13q- la supervivencia era más corta (143 meses).

**Figura 17. Supervivencia global según los grupos de FISH al considerar a los 128 pacientes con delección de 13q14 como  $< 6$  o  $\geq 80\%$  de pérdidas**

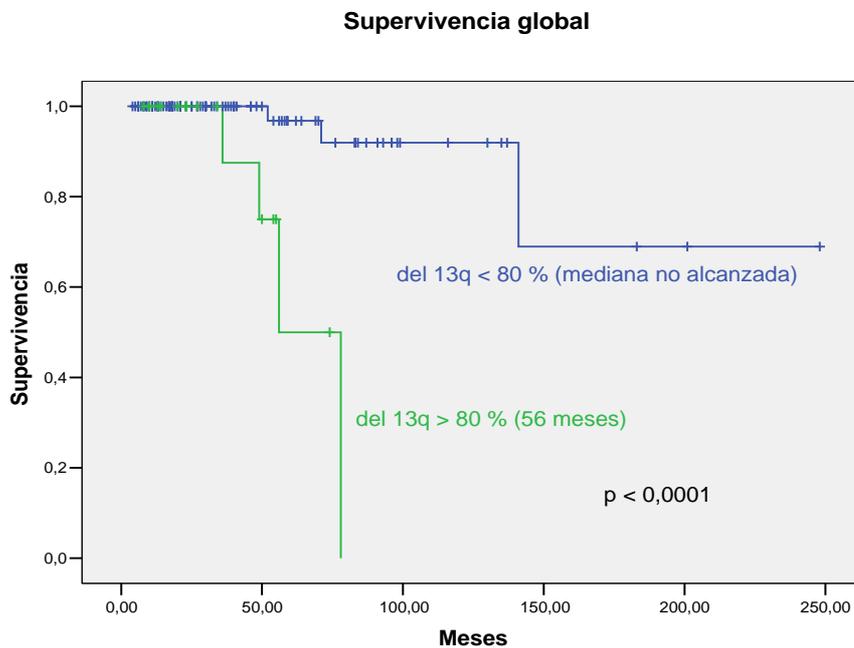


### 5.3.1.3. Análisis de la supervivencia y del tiempo hasta la progresión en los diferentes subgrupos de infiltración por células 13q-

Cuando se consideraron exclusivamente los pacientes con 13q- como única alteración citogenética en el momento del diagnóstico, al establecer diferentes puntos de corte ( $< 80$  vs  $\geq 80$  y  $< 50$  vs  $51-79$  vs  $\geq 80$ ) tanto la supervivencia como el tiempo hasta el primer tratamiento fueron más largos en los enfermos con menor número de pérdidas. Así, en la cohorte de pacientes con un porcentaje de pérdidas en 13q14  $< 80\%$  se observó que la supervivencia era significativamente superior ( $p = 0,0001$ ) así como el tiempo transcurrido hasta el primer tratamiento ( $p = 0,05$ ) (Figuras 18 y 19).

**Figura 18. A. Supervivencia global y B. Tiempo hasta el primer tratamiento de los pacientes con LLC-B y deleción de 13q14 como única alteración citogenética y un porcentaje de pérdidas por FISH  $< 6 \geq 80\%$**

A.



B.

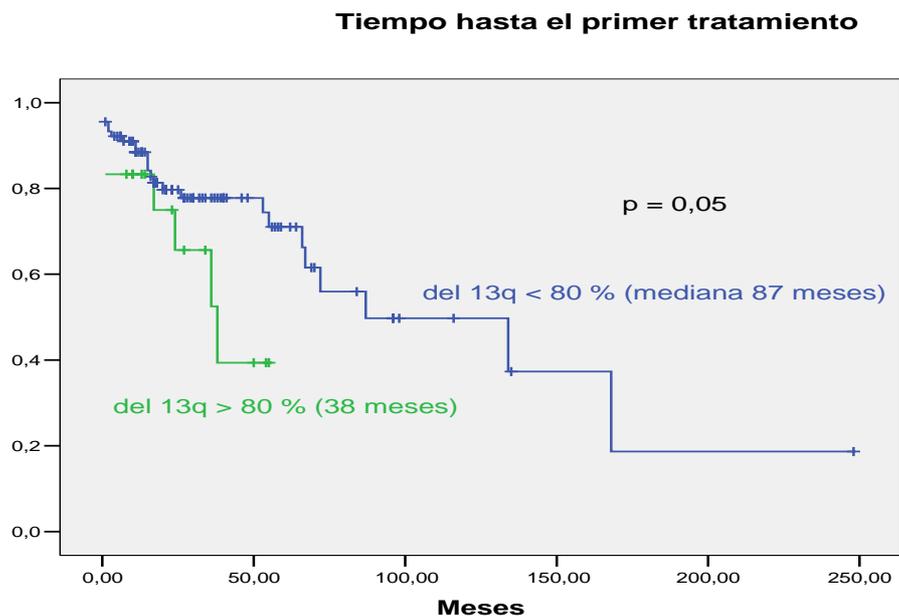
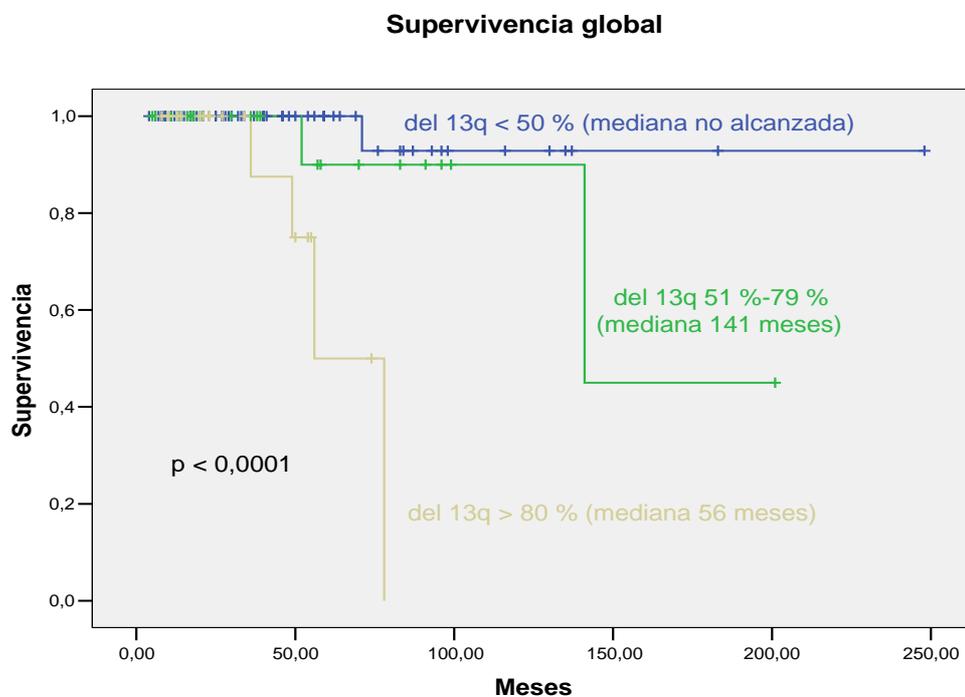


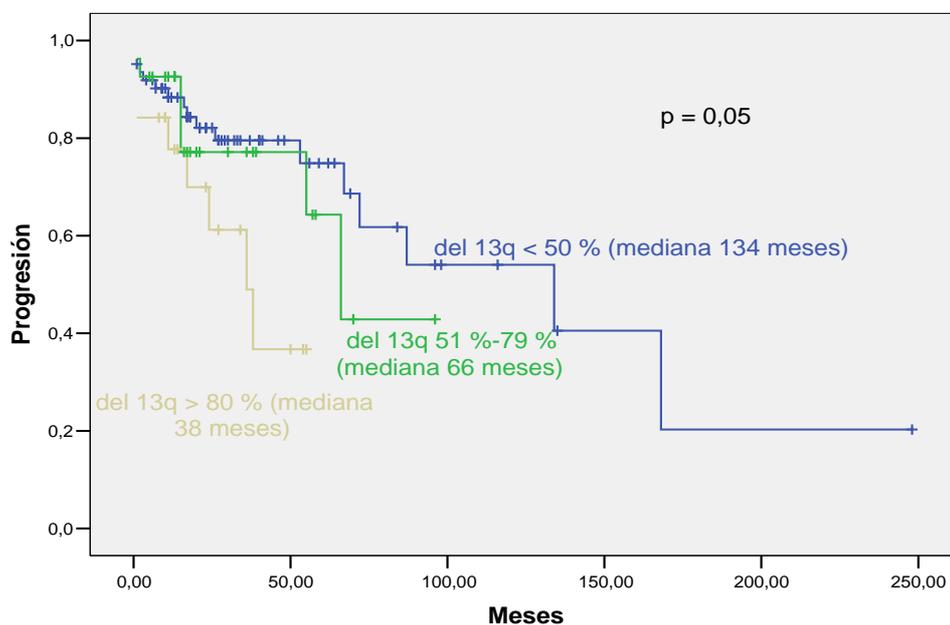
Figura 19. A. Supervivencia global y B. Tiempo hasta el primer tratamiento de los pacientes con LLC-B y delección de 13q14 como única alteración citogenética y un porcentaje de pérdidas por FISH < 50%, entre 51-79 % ó ≥ 80%

A.



## B.

Tiempo hasta el primer tratamiento



El análisis univariante puso de manifiesto que las variables con significación estadística que influyeron en la SG fueron el porcentaje de pérdidas en 13q14, la presencia de esplenomegalia y de síntomas B (Tabla 22). En el análisis multivariante, las variables incluidas en el modelo final fueron el porcentaje de pérdidas en 13q14 ( $p = 0,001$ ) y la presencia de síntomas B ( $p = 0,007$ ).

Como se observa en la Figura 19, el TPT fue superior en la cohorte de pacientes con un número de pérdidas en 13q14  $\leq 50\%$  (mediana de 134 meses) en relación con los que presentaban un porcentaje de pérdidas entre 51%-79% (mediana de 66 meses) y  $\geq 80\%$  (mediana de 38 meses;  $p = 0,05$ ).

Las variables asociadas con un TPT más corto fueron: presentar un número alto de pérdidas en 13q14 ( $p = 0,05$ ), la presencia de pérdidas bialélicas en 13q14 ( $p = 0,05$ ), el patrón no mutado de IgV<sub>H</sub>, el nivel elevado de LDH sérica, de  $\beta_2$ microglobulina, la existencia de una prueba de Coombs directa positiva, la esplenomegalia, la presencia de síntomas B, el estadio clínico y el patrón de infiltración difuso de la médula ósea (todos

ellos con un valor de  $p < 0,0001$ ) (Tabla 23). En el análisis multivariante del TPT, sólo se incluyeron el patrón no mutado de IgV<sub>H</sub> ( $p = 0,001$ ) y la cifra elevada de la  $\beta_2$ microglobulina ( $p = 0,003$ ).

**Tabla 22. Análisis univariante de la supervivencia de los 109 pacientes con delección de 13q14 como única alteración citogenética al diagnóstico**

Variable	Supervivencia global*	Valor de P (log-rank)
Delección de 13q14 como única alteración citogenética (% de pérdidas $< 80/ \geq 80$ )	NA/56	$< 0,001$
Delección de 13q14 mono/bialélica	186/184	ns
Estado mutado/no mutado ( $\geq 2\%$ )	NA/80	ns
CD38 ( $\geq 7\%$ ): -/+	154/97	0,05
CD38 ( $\geq 30\%$ ): -/+	154/67	ns
Sexo (♂/♀)	141/NA	0,014
Edad $< 65$ vs $\geq 65$ años	159/104	0,004
Edad $< 50$ vs $\geq 50$ años	NA/143	ns
Prueba de Coombs +/-	97/159	0,007
LDH sérica alta/normal	56/159	$< 0,0001$
$\beta_2$ microglobulina sérica alta/normal	86/152	$< 0,0001$
Hepatomegalia Sí/No	143/159	ns
Esplenomegalia Sí/No	67/159	$< 0,0001$
Síntomas B Sí/No	62/NA	$< 0,0001$
Estadio de Binet A/B/C	NA/75/52	$< 0,0001$
Estadio de Binet A vs otros	NA/74	$< 0,0001$
Estadio de Rai 0/1/2/3/4	NA/154/75/40/57	$< 0,0001$
Infiltración de la MO (difuso vs no difuso)	97/NA	$< 0,0001$
LLC score (Matutes et al) 3, 4, 5	101/152/200	ns

\*Expresado como mediana en meses; NA: mediana no alcanzada; ns: no significativa.

**Tabla 23. Análisis univariante del tiempo hasta el primer tratamiento de los 109 pacientes con delección de 13q14 como única alteración citogenética al diagnóstico**

Variable	Tiempo hasta el primer tratamiento*	Valor de P (log-rank)
Delección de 13q14 como única alteración citogenética (% de pérdidas $< 80/ \geq 80$ )	87/38	0,05
Delección de 13q14 mono/bialélica	134/53	0,05
Estado mutado/no mutado ( $\geq 2\%$ )	106/16	$< 0,0001$
CD38 ( $\geq 7\%$ ): -/+	175/80	ns
CD38 ( $\geq 30\%$ ): -/+	175/66	ns
Sexo (♂/♀)		ns
Prueba de Coombs +/-	1/87	$< 0,0001$
LDH sérica alta/normal	2/87	$< 0,0001$
$\beta_2$ microglobulina sérica alta/normal	55/134	0,0001
Hepatomegalia Sí/No		ns
Esplenomegalia Sí/No	15/134	$< 0,0001$
Síntomas B Sí/No	1/134	$< 0,0001$
Estadio de Binet A/B/C	134/15/1	$< 0,0001$
Estadio de Binet A vs otros	134/7	$< 0,0001$
Estadio de Rai 0/1/2/3/4	168/15/16/1/2	$< 0,0001$
Patrón de infiltración de la médula ósea (difuso vs no difuso)	26/134	0,002

\*Expresado como mediana en meses; ns: no significativa.

#### 5.3.1.4. Perfiles de expresión génica (PEG) de los subgrupos de LLC-B según las pérdidas de 13q14

Para el análisis de los PEG se compararon dos grupos de enfermos con deleción del cromosoma 13q14. En el primero de ellos, con un porcentaje de pérdidas de 13q14 > 80% (grupo A) se incluyeron 15 pacientes y en el segundo, con un porcentaje de pérdidas de 13q14 < 80% (grupo B) se incluyeron 22 casos. El análisis comparativo del PEG en ambos grupos identificó un grupo de 1.755 genes expresados diferencialmente: 1.073 genes se hallaban sobrerregulados en el grupo A y 682 genes infraregulados (Figura 20).

Los análisis de función genética revelaron que la mayoría de estos genes estaban involucrados en la apoptosis, en la proliferación y crecimiento celular así como en la actividad mediada por el calcio, la mitocondria y el retículo endoplásmico (RE) (Tabla 24). Así, los pacientes que presentaban más del 80% de pérdidas de 13q14 tenían sobreexpresión de genes relacionados con proliferación celular y actividad MAP kinasa, tales como *ATF2*, *FGF3*, *FGF10*, *FGFR2*, *RRAS2*, *GRB2*, *JUN*, *MAPT* y *MAP3K1*. Por el contrario, este grupo de enfermos tenían infraregulados genes relacionados con la apoptosis (*PDCD10*, *EGLN3*, *CASP6*, *CL* y *DAPK1*) y la parada del ciclo celular, tales como *CDKN2C*, *GAS2L1*, *UHMK1*, *GAS1*, *GAS2L3*, *ZAK* y *GAS7*. Además, la mayoría de los genes implicados en la función del proteasoma (PSM), se hallaban infraregulados en el grupo de pacientes con pérdidas en 13q > 80% de las células. Los genes disrregulados del PSM observados en nuestro estudio codifican subunidades proteosómicas, tanto catalíticas (PSMA 1-7) como regulatorias (PSMD1, PSMD7). El proceso de ubiquitinación también se hallaba alterado. Así, diversas enzimas que participan en diferentes pasos del ciclo de la ubiquitina estaban infrareguladas en el

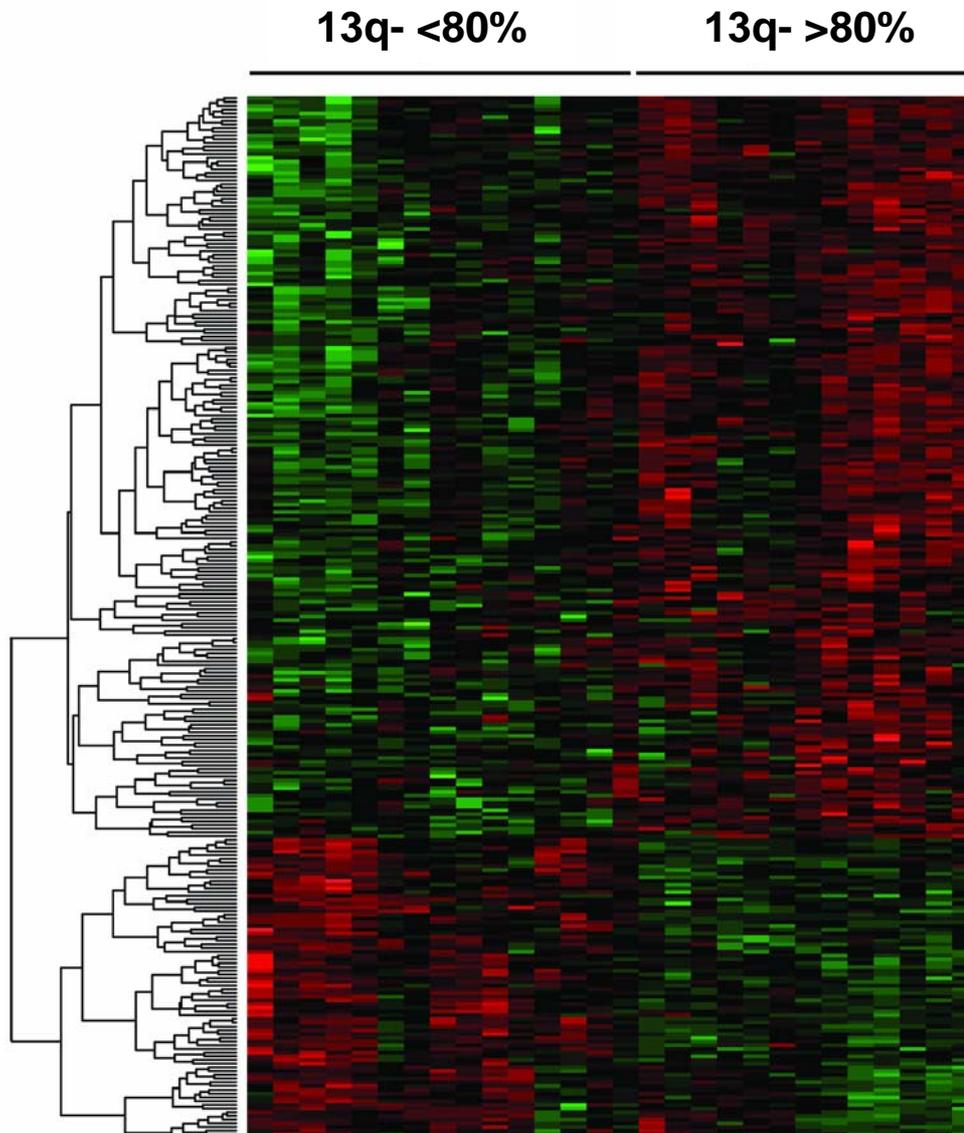
grupo de más pérdidas en 13q: peptidasas (USP27X), enzimas de conjugación de la ubiquitina (UBE2), thiolesterasas (UCHL3) y ligasas (HECTD1).

Es decir, los pacientes con LLC-B con un alto número de pérdidas en 13q14 presentaban una tasa alta de proliferación, infraexpresión de genes relacionados con la apoptosis y disregulación de genes relacionados con las funciones mitocondriales comparados con aquellos con los que tenían un porcentaje inferior de pérdidas de 13q14.

**Tabla 24. Genes más relevantes expresados en los pacientes con más de un 80% de pérdidas en 13q14 (↑: sobreexpresado en el grupo con más del 80% de células 13q-↓: infraexpresado en este grupo)**

Función	Genes	Expresión
Apoptosis	<i>PDCD10, EGLN3, CLU, DAPK1, E2F1, UNC5B, NGFRAP1, HIPK2, APP, GLRX2, BCAP29, EIF2AK2, RAD21, BNIP2, ZBTB16, CASP6, SCARB1</i>	↓
Proliferación		
Parada del ciclo celular	<i>CDKN2C, GAS2L1, UHMK1, GAS1, GAS2L3, ZAK, GAS7</i>	↓
	<i>ATF2, FGF3, FGF10, FGFR2, RRAS2, GRB2, JUN, MAPT,</i>	
Rutas de señalización de MAPK	<i>MAP3K1, GADD45B, PPP3CA, PPP3CC, PRKCA, PRKCG, RASGRF1, SOS1, TGFBR2, CACNA1A, CACNA1D, CACNA1E, CACNB1, MAP3K14, CACNA2D2, MAPK8IP1, CDC25B</i>	↑
Actividad mediada por la proteína de degradación de la ubiquitina	<i>USP27X, PSMA1, PSMA2, PSMA3, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, UBE2D1, UBE2E1, UCHL3</i>	↓
	<i>CYLD, USP22, USP40, STAMBPL1, USP28, USP32, USP6</i>	↑

**Figura 20. Análisis no supervisado de los pacientes con delección de 13q14 en más del 80% de sus células (grupo A) y de los casos con menos del 80% (grupo B).** ). Gráfico de los perfiles de expresión de los enfermos con LLC y pérdidas en 13q, donde se compara la expresión de los casos con más de 80% de células con pérdidas en 13q frente a los casos con menos del 80% de pérdidas en 13q. Cada fila representa un gen deregulado y cada columna un enfermo. En rojo se muestran los genes sobreexpresados en los casos con mayor número de pérdidas en 13q.



### 5.3.2. Discusión

Desde hace varios años se ha considerado que los pacientes con LLC-B que tienen mejor pronóstico son los que presentan delección en 13q14 como única alteración citogenética, incluso ligeramente mejor que en los que la citogenética es normal<sup>15</sup>. Sin embargo, en el análisis de algunas de las series publicadas<sup>12</sup> y en la serie de 350 pacientes objeto principal del estudio de este trabajo, se ha podido observar un entrecruzamiento de las curvas de supervivencia y de tiempo hasta la progresión en los pacientes con citogenética normal y pérdida del cromosoma 13q14. En el caso de la supervivencia, este hecho tiene lugar a los 12-13 años. En nuestra serie se observó que la mediana de supervivencia de los enfermos con pérdida en la región 13q14 era de 156 meses y que no se había alcanzado en el momento del cierre del estudio en los pacientes con citogenética normal. Con el objetivo de explicar la causa de esta observación se realizó el estudio clínico y biológico que se discute en este apartado.

Nuestros resultados reflejan que los pacientes que tienen una infiltración alta por células 13q- ( $\geq 80\%$ ) no muestran características clínicas diferentes del resto de enfermos con LLC y 13q-, excepto por el hecho de tener un recuento linfocitario mayor así como una tendencia a presentar patrón de infiltración difuso de la médula ósea y más esplenomegalia. Sin embargo, estos pacientes tienen un curso clínico significativamente peor.

Aunque el seguimiento fue relativamente corto para una enfermedad crónica (mediana de 42 meses), el subgrupo de pacientes con un número alto de células con 13q- presentó tanto una menor supervivencia como un menor tiempo hasta la progresión. Estos resultados fueron similares al utilizar diferentes puntos de corte en el número de células 13q- ( $\leq 50$ ; 51-79;  $\geq 80$ ; 10-40, 41-70,  $\geq 70$ ).

En nuestro conocimiento, es la primera vez que el porcentaje de células con pérdidas en el cromosoma 13q14 se asocia con la supervivencia y la progresión en la LLC-B. La relevancia clínica del número de células que tienen una alteración genética se ha demostrado recientemente en un estudio del grupo inglés de LLC. Así, la presencia de más de un 20% de células con pérdidas en *TP53* se asocia con un pronóstico peor en los pacientes con LLC, mientras que los pacientes con pérdidas en *TP53* en menos del 20% de sus células tienen un pronóstico similar a los enfermos de la serie global<sup>88</sup>. En nuestro estudio, se observó que en el grupo de pacientes con pérdida de 13q los únicos factores adversos para la supervivencia global en el análisis multivariante fueron la presencia de un número alto de células 13q- y la sintomatología B. A pesar de que en el tiempo hasta la progresión el porcentaje de pérdidas en 13q- no entró en el modelo final del estudio multivariante sí que lo hizo en el estudio univariante. En nuestra experiencia, el número alto de pérdidas en 13q14 no está relacionado con un mayor porcentaje de pérdidas bialélicas de 13q- en los pacientes. Este subgrupo de enfermos con homocigosis de 13q14 no presenta una supervivencia peor, aunque parecen precisar tratamiento antes (53 meses vs 134 meses;  $p = 0,05$ ). Por tanto, nuestros hallazgos indican que el citogenetista debe informar al clínico del porcentaje de pérdidas por FISH en los pacientes con LLC y no sólo proporcionar el resultado cualitativo de si el enfermo presenta o no 13q-<sup>281</sup>.

En la segunda parte de este apartado se analizaron las características biológicas intrínsecas y distintivas de los enfermos con pérdidas elevadas de 13q-. Para ello, se realizó un estudio de los perfiles de expresión génica (PEG) de este grupo de LLC. Esta metodología se ha utilizado con éxito en la identificación de diferencias génicas entre células tumorales y normales, al proporcionar un mayor conocimiento de la biología de los tumores<sup>24</sup> y, en concreto, de la LLC-B<sup>225-227,282,283</sup>, donde ha puesto de manifiesto

que todos los casos con esta enfermedad muestran una firma genética común que difiere de las células normales y de otras células malignas<sup>230,231</sup>. Recientemente, se ha comunicado que un alto grado de complejidad genómica puede servir como un potente marcador pronóstico adverso en la LLC-B para identificar pacientes con enfermedad agresiva<sup>284</sup>. Además, a nivel de 13q14 se han comenzado a caracterizar diferencias en los PEG que clasifican grupos de pacientes<sup>285</sup>.

En nuestro estudio, se han logrado identificar importantes funciones disreguladas en los dos grupos de pacientes analizados según un número de pérdidas de 13q-. Las principales rutas genéticas involucradas son las relacionadas con la apoptosis, la proliferación y las funciones de la mitocondria y del RE, así como con las vías de ubiquitinización. Los pacientes con más células 13q- presentan una sobreexpresión de genes implicados en la proliferación. Así, la ruta de señalización de *MAPK* se haya afectada debido a que *GRBS*, *RRAS*, *JUN* o *SOS1* están sobrerregulados en el grupo de LLC-B con un alto número de pérdidas en 13q. Además, algunos genes relacionados con la fase de parada del ciclo celular, tales como *CDKN2C*, *GAS2L1*, *GAS1*, *GAS7*, *ZAK* y *GAS2L3* estaban infraexpresados en el grupo de enfermos con más pérdidas en 13q. Ambas circunstancias, esto es, la sobrerregulación de *MAPK* y la infraexpresión de genes relacionados con la parada del ciclo celular conducen a una mayor proliferación celular<sup>286</sup>. Por consiguiente, este grupo de LLC tendría más proliferación que los casos con un número bajo de células 13q-. Por el contrario, en el grupo de pacientes con pérdidas en 13q > 80% se observó la infraexpresión de genes relacionados con la apoptosis, con menor expresión de los genes *CASP6*, *CLU*, *DAPK1* y *E2F1*, lo que produjo un descenso en la actividad de la apoptosis. La característica propia de la LLC es la acumulación de las células B maduras que escapan de la muerte celular programada y entran en las fases de parada celular (fases G0/G1)<sup>287</sup>. El análisis del

transcriptoma en el grupo de enfermos con pérdidas elevadas de 13q condicionaría una menor entrada de células en apoptosis, lo que podría estar en relación con una agresividad clínica mayor.

Además de esta alteración en las rutas “clásicas” de apoptosis, en nuestro estudio se han observado alteraciones en otras rutas relacionadas con la muerte celular programada, tales como aquellas mediadas por el metabolismo mitocondrial, el RE y del calcio. La mitocondria desempeña un papel central en la supervivencia celular y en la muerte apoptótica<sup>288</sup>. Recientemente, se ha demostrado que el RE es otro centro de regulación de la muerte celular<sup>289</sup>. Las proteínas de la familia Bcl-2 se localizan en estas organelas celulares (mitocondrias y RE) y pueden actuar como canales iónicos<sup>290,291</sup>. En nuestro estudio, el metabolismo mitocondrial y del RE, así como la actividad mediada por el calcio, se hallaban alteradas. Por ello, el transporte del RE y de las proteínas vesiculares se encuentra inhibido debido a la sobrerregulación de genes implicados en la actividad mediada por el calcio, tales como la unión a la calmomodulina y al ion calcio. Además, también se observó que la actividad oxireductasa mitocondrial se hallaba inhibida en el grupo de pacientes con LLC-B y un número alto de pérdidas en 13q. Debido a este hecho, la fosforilación oxidativa, la actividad de transporte de electrones y la actividad oxireductasa estaban inhibidas en este grupo de enfermos. Todo ello contribuiría a un menor grado de apoptosis en estas células con mayores pérdidas de 13q.

La dependencia del ATP de la apoptosis es bien conocida y, tanto a la cadena respiratoria<sup>292</sup> como a la sintetasa del ATP en sí misma, se les ha otorgado papeles destacados en el proceso de la apoptosis<sup>293</sup>. Por todo ello, los pacientes con un número alto de pérdidas en 13q tienen no sólo más proliferación, sino también menos apoptosis (tanto la mediada por la vía clásica como la dependiente de estas nuevas rutas), lo que

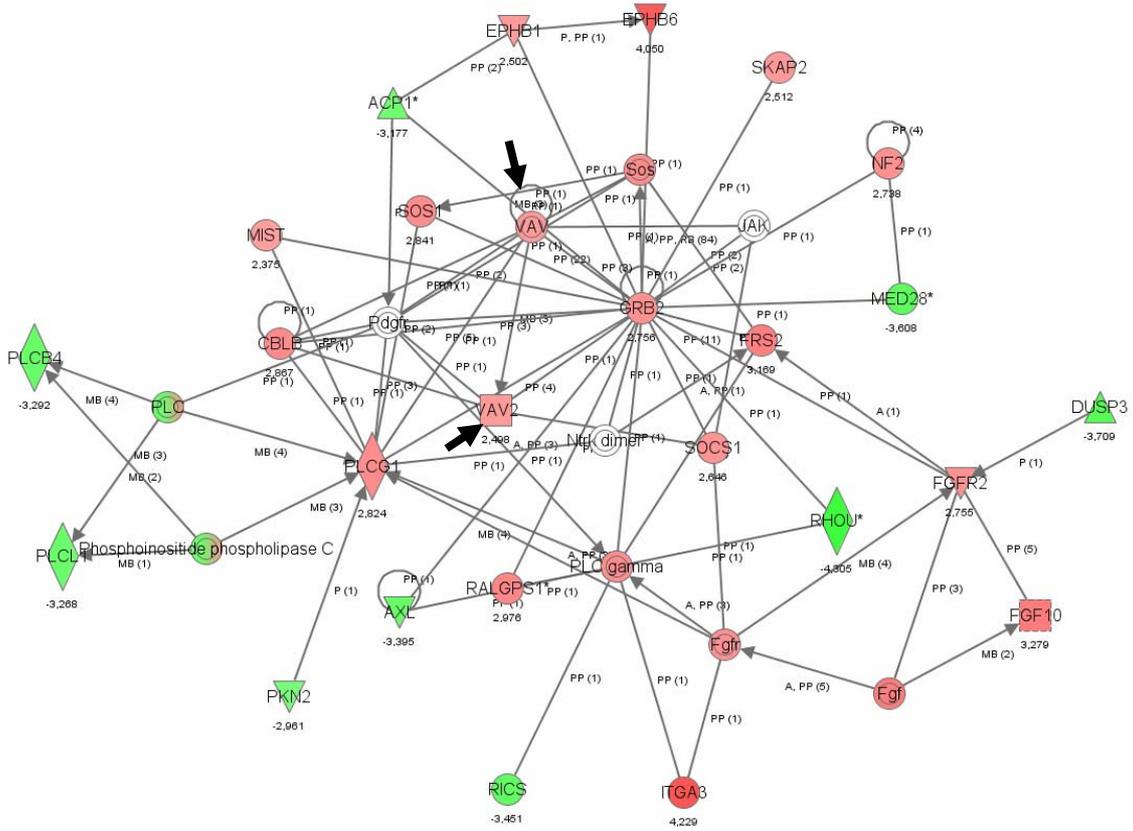
podría explicar el comportamiento más agresivo de la enfermedad, como se ha observado en el estudio clínico.

En los últimos años, diversas neoplasias hematológicas se han tratado con inhibidores de proteasomas. Nuestro estudio apoya la idea de que la función del proteasoma se halla inhibida en los pacientes con LLC-B y un porcentaje alto de pérdidas en 13q. En la LLC-B, los resultados clínicos del uso del inhibidor de proteasomas bortezomib han sido peores que en otras hemopatías malignas<sup>294</sup>. Por ello, es posible que estos agentes deban restringirse a los enfermos con LLC en los que el proteasoma esté activado.

Por todo lo expuesto, nuestros hallazgos confirman que los pacientes con LLC-B y pérdida de 13q14 no pueden considerarse globalmente. Un número alto de pérdidas en 13q cuantificadas por FISH se asocia con una supervivencia global y tiempo hasta la progresión más cortos. Es la primera ocasión en la que el porcentaje de pérdidas en 13q14 se ha asociado con la supervivencia y progresión en los enfermos con LLC-B. Además, en este subgrupo de pacientes se ha observado más proliferación y menos apoptosis. Aún así, estos resultados deben confirmarse en estudios adicionales, preferentemente en el contexto de ensayos clínicos aleatorizados con un número elevado de pacientes.

Por último, el estudio del PEG demostró la presencia de una sobreexpresión del protooncogén Vav (y de la subunidad Vav2) en los enfermos con un elevado número de células con 13q-. Estos genes codifican proteínas esenciales en la traducción de señales que catalizan el intercambio GDP/GTP en la familia Rho/Rac. Su desregulación ocasiona transformación celular<sup>295</sup>. Por este motivo, se planteó estudiar de manera específica estas proteínas en la LLC, lo que constituyó el cuarto y último capítulo del presente trabajo.

**Figura 21. Representación esquemática de los genes desregulados en los enfermos con LLC y pérdidas elevadas de 13q.** Los genes sobreexpresados en este grupo se muestran en rojo, mientras que los sobreexpresados en el grupo de 13q con < del 80% de infiltración se representan en verde. Los genes que codifican para Vav y Vav2 están sobreexpresados en los casos con  $\geq$  13q- (flechas).



## 5.4. La sobreexpresión del producto del proto-oncogén VAV se asocia con las leucemias linfáticas crónicas con delección en 13q (Anexo 3)

### 5.4.1. Resultados

Como parte final del trabajo de tesis doctoral se analizó en profundidad el papel del proto-oncogén VAV en la LLC, para lo cual lo primero que se estudió fue su relación con las hemopatías malignas, ya que hasta el momento se había observado su implicación en otros tumores no hematológicos. Para ello se realizó un estudio en muestras de médula ósea de 118 pacientes no seleccionados con SMP (32 casos), LLA-B (10 enfermos), LNH (15 pacientes) y LLC-B (61 casos). La Tabla 25 resume los resultados obtenidos. Cabe destacar que ni la proteína Vav ni su forma fosforilada pudieron detectarse en ninguna de las 42 muestras obtenidas de los pacientes con SMP ni con LLA. Por el contrario, en el 34,4% y en el 27,9% de los pacientes con LLC-B se observaron niveles incrementados de la proteína Vav y de su forma fosforilada, respectivamente, en el análisis de las muestras procedentes de médula ósea ( $p = 0,002$ ). Dos enfermos con LNH (13%) también presentaron sobreexpresión de VAV.

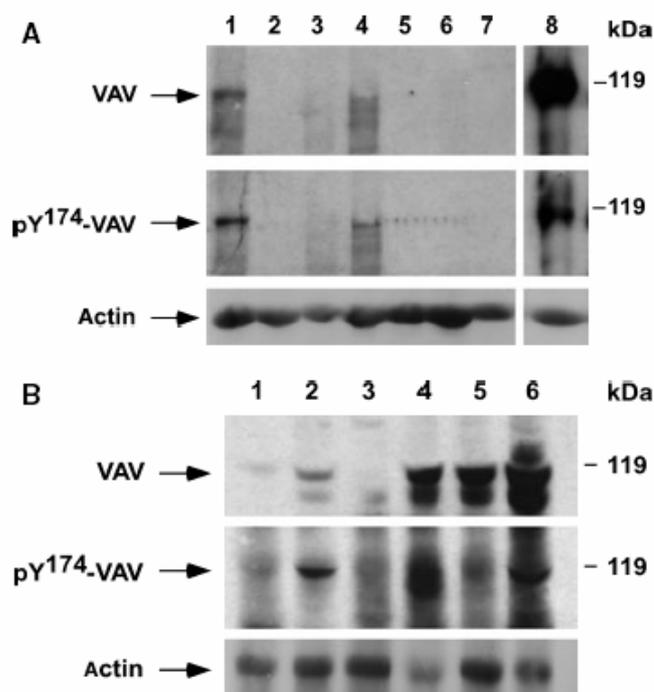
**Tabla 25. Sobreexpresión del producto del proto-oncogén VAV en relación con el tipo de tumor hematológico analizado**

Enfermedad	n <sup>a</sup>	Positivos <sup>b,c</sup>	
		VAV	
		Sobreexpresión	Fosforilación
<b>SMP</b>			
Policitemia Vera	11	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
Trombocitemia esencial	12	0	0
Metaplasia mieloide agnógena	3	0	0
Leucemia mieloide crónica	3	0	0
SMD/SMP no clasificables <sup>d</sup>	3	0	0
LLA-B	10	0	0
LNH-B	15	2	2
<b>LLC-B</b>			
Cariotipo normal por FISH	33	7 <sup>b</sup>	6 <sup>c</sup>
Delección de 13q14	14	10	8
Trisomía 12	6	1	0
Delección de 17p13	6	2	2
Delección de 11q22	2	1	1

<sup>a</sup>Nº de pacientes en el grupo de la enfermedad indicada. <sup>b,c</sup>Nº de casos positivos para (b) la sobreexpresión de VAV o (c) la fosforilación de VAV en el residuo regulador Y<sup>174</sup>, determinado por análisis de *immunoblot*. <sup>d</sup>SMD/SMP: Síndrome mielodisplásico/Síndrome mieloproliferativo crónico; SMP: Síndrome mieloproliferativo crónico; LLA-B: leucemia linfoblástica aguda B; LNH-B: linfoma no hodgkiniano B; LLC-B: leucemia linfática crónica B.

Mientras que las MO de los controles sanos no expresaban la proteína Vav ni su fracción fosforilada, un porcentaje alto de los pacientes con LLC-B con delección de 13q presentaron niveles altos tanto de la proteína Vav (71,4%) como de la fracción fosforilada (57,1%) (Figura 22). Por el contrario, tanto en los pacientes con LLC-B sin alteraciones citogenéticas (21,2% y 18,2 %, respectivamente) como en los enfermos con trisomía del cromosoma 12 o con pérdidas en 11q o en 17p, la frecuencia de la sobreexpresión de la proteína VAV y de su forma fosforilada (16,6% y 33,3%, respectivamente) fue, también, más baja que en los casos con LLC-B y delección de 13q.

**Figura 22. Análisis de los niveles de la proteína VAV en células de médula ósea de pacientes con LLC-B.** **A.** A los lisados celulares obtenidos de células de la médula ósea de pacientes con LLC-B (líneas 1-4) o individuos sanos (líneas 5-7) se les realizó un *immunoblot* con anticuerpos anti-VAV (panel superior). Se utilizó el mismo filtro de *immunoblot* con anticuerpos anti-fosfo VAV Y<sup>174</sup> (panel inferior). Como control positivo, se incluyó en este análisis un extracto celular de células COS-1 quiescentes que expresaban ectópicamente una versión de VAV que se estimuló con factor de crecimiento epidérmico (FCE) durante 10 minutos a 37°C (línea 8). La movilidad electroforética de las proteínas Vav y Vav fosforilada se indica mediante flechas (parte izquierda de los paneles). La posición de los pesos moleculares se indica a la derecha. **B. Niveles de activación de JNK en células de médula ósea de pacientes con LLC-B.** Lisados celulares derivados de células de médula ósea de 6 pacientes con LLC-B analizadas según se ha indicado anteriormente. La movilidad electroforética de las proteínas Vav y Vav fosforilada se indica mediante flechas (parte izquierda de los paneles). La posición de los pesos moleculares se indica a la derecha.



#### 5.4.2. Discusión

A lo largo de este trabajo de tesis doctoral se ha puesto de manifiesto que la LLC-B es una enfermedad heterogénea, tanto a nivel genético como clínico. Además de las alteraciones genéticas, ya estudiadas en profundidad en los capítulos previos, es conocido que en la LLC-B hay una disregulación importante en algunas vías de transducción de señales<sup>200</sup>. De esta manera, los estudios del transcriptoma revelan que los pacientes con LLC-B y 11q- tienen alteraciones de algunos reguladores del ciclo celular tales como *CDC2*, *CDK5*, *CDC16* y *E2F*<sup>170</sup>. Además, se ha demostrado que en la progresión de esta enfermedad pueden estar implicadas otras proteínas, como tirosina kinasas (*ZAP-70*, *SYK*)<sup>13,229</sup>, lípido kinasas (*PI3-K*)<sup>296</sup>, serina/treonina kinasas (proteína quinasa B, proteína quinasa C)<sup>297</sup> y factores de transcripción, como *NFκB*<sup>298</sup>. De todas ellas quizás sea *ZAP-70*, una quinasa que generalmente sólo actúa a nivel de los linfocitos T, la más estudiada en la LLC-B, donde se asocia con la ausencia de mutación de *IgV<sub>H</sub>* y cuya expresión condiciona mal pronóstico<sup>139,229</sup>. Además, se ha demostrado que la ruta de *PI3-K/NFκB* es importante a la hora de promover supervivencia en las células de la LLC<sup>299</sup>. La importancia de estas vías de señalización es crucial para comprender la biología de esta enfermedad y, de hecho, algunos de los fármacos usados en la LLC actúan mediante la inhibición de estas rutas de proliferación celular o favoreciendo la apoptosis. Es evidente que las vías implicadas en la LLC no están restringidas a las descritas hasta ahora. Por ello, en nuestro estudio nos propusimos analizar la implicación del proto-oncogén *VAV* en la LLC y se demostró que esta proteína constituye otra señal de transducción implicada en los enfermos con LLC-B, especialmente en los que tienen 13q-. Es preciso destacar que de todas las hemopatías analizadas, las únicas en las que se observaba afectación de esta proteína eran los

procesos linfoproliferativos B y, de manera especial, la LLC-B, lo que hablaría a favor de una implicación de las rutas en las que participa Vav en el desarrollo de la LLC-B.

En nuestro conocimiento, es la primera vez que se observa una alteración de la expresión del proto-oncogén VAV en una hemopatía maligna. El hallazgo de una sobreexpresión de este gen en la LLC-B es un dato que no se había observado previamente en estudios del transcriptoma mediante microarrays de expresión<sup>225,226</sup>, pero que se pudo poner de manifiesto en los estudios realizados en los enfermos con pérdidas elevadas de 13q en nuestro análisis. El aumento en los niveles de Vav en la LLC podría ser debido a una mayor transducción de su ARNm o bien a la estabilización de esta proteína producida por mecanismos desconocidos. En nuestro estudio no sólo se observó una sobreexpresión de Vav, sino un aumento en la fosforilación de la proteína, lo cual puede explicarse como una consecuencia indirecta de su sobreexpresión, tal y como se ha demostrado en líneas celulares B y T con trasfecciones transitorias del producto de Vav<sup>300</sup>. Aunque se desconoce la causa final por la que se produce este mecanismo es posible que la sobreexpresión de Vav pueda sobrepasar la capacidad basal de la tirosín fosfatasa encargada de desfosforilar el Vav endógeno, lo que ocurre en condiciones normales, y, de esta manera, aumentar los niveles de Vav.

La disregulación de la proteína Vav en la LLC-B no es un hallazgo sorprendente dado el papel clave que desempeñan los genes de la familia Vav en la transducción de señales en los linfocitos B. Así, se ha demostrado que la pérdida del gen VAV por recombinación homóloga induce, en el modelo murino, una proliferación anormal de las células B maduras y genera, de manera anómala, células B en el peritoneo. Además de lo expuesto, no debería sorprender que la implicación de este oncogén esté restringida a la LLC-B, ya que se ha demostrado en modelos animales que la eliminación de los genes VAV y VAV2 provoca defectos en el desarrollo, proliferación y señalización de los

linfocitos B<sup>301,302</sup>. Por otra parte, se ha sugerido que las proteínas Vav podrían regular rutas clave en la LLC-B, tales como la ruta de PI3-K/proteína kinasa y las vías dependientes de proteína kinasa C<sup>302</sup>. Los mecanismos moleculares que desencadenaría esta sobreexpresión de proteínas Vav podrían afectar a la vía de Ras, por medio de la alteración del factor de intercambio RasGRP1<sup>303</sup>, a la activación de Rap1 mediante el factor de intercambio RasGRP2<sup>304</sup> o a la activación de las proteínas kinasas D1 y C (X.R. Bustelo, comunicación personal). De hecho, los estudios de microarrays de expresión muestran una sobreexpresión de Vav y de Vav2 en los enfermos con pérdidas altas de 13q. Basados en estos resultados es posible que la sobreexpresión de Vav pudiera ayudar a la activación de otras vías de señalización que promovieran la supervivencia celular, la proliferación o la migración de los linfocitos clonales de la LLC-B. Sin embargo, quedan algunas cuestiones pendientes de resolver, como la especial incidencia de esta alteración en los casos de LLC-B con 13q- y que pudiera invocar la presencia de mecanismos metabólicos distintos en los enfermos con 13q-, especialmente en aquéllos que tienen un elevado número de pérdidas de esta región. Por tanto, es preciso profundizar en el conocimiento de esta nueva ruta implicada en la LLC-B mediante nuevos estudios de genómica y de proteómica.

## **6. Conclusiones**

1. Los resultados de nuestra serie reproducen en sus aspectos básicos los obtenidos por otros grupos: los enfermos que tienen pérdidas en 13q o citogenética normal presentan un pronóstico favorable, mientras que los pacientes con trisomía del cromosoma 12 tienen un pronóstico intermedio. Por el contrario, los casos con pérdidas en 11q o 17p tienen un peor pronóstico. Aún así, como se ha observado en algunas otras series, los pacientes con citogenética normal presentan a largo plazo supervivencias más prolongadas que los que tienen pérdidas en 13q.

2. El análisis de la región IgV<sub>H</sub> revela que las LLC con patrón mutado de IgV<sub>H</sub> y usado VH-3 tienen un pronóstico favorable, mientras que los enfermos con patrón no mutado de IgV<sub>H</sub> o usados VH-1 presentan supervivencias más cortas. La presencia de VH3-21, un usado con mal pronóstico, tiene una incidencia baja en nuestra serie, al igual que sucede en los países del sur de Europa. El segmento VH5-51 suele mostrarse en su forma no mutada y confiere un especial mal pronóstico.

3. La traslocación 14q32/*IGH* está presente en el 7% de los pacientes con LLC-B. El gen *IGH* se reordena con *BCL2* en la mayoría de los casos y de manera esporádica con otros genes como *BCL11A*, *CCND3* y *CDK6*.

4. Los pacientes con LLC-B y traslocación 14q32/*IGH* tienen un curso clínico peor en lo referente a la supervivencia y progresión que los de pronóstico favorable (13q- y citogenética normal) e intermedio (trisomía del 12) por FISH, por lo que este grupo debería incluirse en la clasificación jerárquica de riesgo citogenético entre el riesgo intermedio y el desfavorable.

5. Los pacientes con LLC-B y un número mayor de pérdidas en el cromosoma 13q, como única alteración citogenética, presentan una supervivencia global y tiempo hasta la progresión más cortos que los que tienen trisomía del cromosoma 12, citogenética normal o un porcentaje bajo de células con pérdidas en 13q. Estos, a su vez, presentan un mejor curso clínico que los casos con citogenética normal.

6. Desde el punto de vista biológico, los pacientes con LLC-B y un número alto de pérdidas en 13q tienen características biológicas diferentes en los perfiles de expresión genética ya que presentan más proliferación y menos apoptosis, lo que podría justificar su peor pronóstico.

7. A diferencia de lo que ocurre en otras hemopatías malignas, en la leucemia linfática crónica se afecta la vía del proto-oncogén VAV, de manera especial en los casos con pérdidas en 13q.

8. Todo ello, demuestra el valor pronóstico de los marcadores citogenéticos y moleculares en el curso de los pacientes con LLC-B y su probable aplicabilidad diagnóstica y clínica.

## **7. Bibliografía**

- 1 Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995;333:1052-1057.
- 2 Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;352:804-815.
- 3 Dighiero G. CLL Biology and Prognosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005;278-284.
- 4 Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004;163-183.
- 5 Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1999;26:107-114.
- 6 Carney DA, Wierda WG. Genetics and molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 2005;6:215-225.
- 7 Guipaud O, Deriano L, Salin H, Vallat L, Sabatier L, Merle-Beral H, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a polymorphic family unified by genomic features. *Lancet Oncol* 2003;4:505-514.
- 8 Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-234.
- 9 Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
- 10 Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996;22:439-447.
- 11 Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood* 2001;97:256-263.
- 12 Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-1847.
- 13 Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1764-1775.
- 14 Hus I, Podhorecka M, Bojarska-Junak A, Rolinski J, Schmitt M, Sieklucka M, et al. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol* 2006;17:683-690.
- 15 Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-1916.
- 16 Kearney L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma* 2005;114:286-294.
- 17 Goorha S, Glenn MJ, Drozd-Borysiuk E, Chen Z. A set of commercially available fluorescent in-situ hybridization probes efficiently detects cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Genet Med* 2004;6:48-53.
- 18 Reddy KS. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol* 2006;132:705-722.

- 19 Gozzetti A, Crupi R, Tozzuoli D. The use of fluorescence in situ hybridization (FISH) in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Hematology* 2004;9:11-15.
- 20 Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-1854.
- 21 Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005;90:391-399.
- 22 Nowakowski GS, Dewald GW, Hoyer JD, Paternoster SF, Stockero KJ, Fink SR, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization with an IGH probe is important in the evaluation of patients with a clinical diagnosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005;130:36-42.
- 23 Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004;10:789-799.
- 24 Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, Dugas M, Hiddemann W, Kern W, et al. Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood* 2005;106:1189-1198.
- 25 Inazawa J, Inoue J, Imoto I. Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci* 2004;95:559-563.
- 26 Ottaggio L, Viaggi S, Zunino A, Zupo S, Rossi E, Spriano M, et al. Chromosome aberrations evaluated by comparative genomic hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with CD38 expression. *Haematologica* 2003;88:769-777.
- 27 Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17:3835-3849.
- 28 Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer* 2004;101:3-27.
- 29 Diehl LF, Karnell LH, Menck HR. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1999;86:2684-2692.
- 30 Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 1998;338:1506-1514.
- 31 Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2004;113:1008-1016.
- 32 Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Keller JL, Haddad J, Jr., Miljkovic V, et al. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2639-2644.
- 33 Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2004;200:519-525.
- 34 Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped

- receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007;109:259-270.
- 35 Dighiero G. Perspectives in chronic lymphocytic leukemia biology and management. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18:927-43, x.
  - 36 Kienle DL, Korz C, Hosch B, Benner A, Mertens D, Habermann A, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol* 2005;23:3780-3792.
  - 37 Korz C, Pscherer A, Benner A, Mertens D, Schaffner C, Leupolt E, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood* 2002;99:4554-4561.
  - 38 Yee KW, O'Brien SM. Chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2006;81:1105-1129.
  - 39 Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia  
1. *Lancet* 2008;371:1017-1029.
  - 40 Leporrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, et al. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 2001;98:2319-2325.
  - 41 Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;107:885-891.
  - 42 Wierda WG, Kipps TJ, Keating MJ. Novel immune-based treatment strategies for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:6325-6332.
  - 43 Faderl S, O'Brien S, Keating MJ. Monoclonal antibody combinations in CLL: evolving strategies. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19:781-793.
  - 44 Wierda WG, O'Brien SM. Initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006;33:202-209.
  - 45 Nabhan C. The emerging role of alemtuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2005;6:115-121.
  - 46 Wendtner CM, Ritgen M, Schweighofer CD, Fingerle-Rowson G, Campe H, Jager G, et al. Consolidation with alemtuzumab in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) in first remission--experience on safety and efficacy within a randomized multicenter phase III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Leukemia* 2004;18:1093-1101.
  - 47 Paneesha S, Milligan DW. Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005;128:145-152.
  - 48 Caballero D, Garcia-Marco JA, Martino R, Mateos V, Ribera JM, Sarra J, et al. Allogeneic transplant with reduced intensity conditioning regimens may overcome the poor prognosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia with unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene and chromosomal abnormalities (11q- and 17p-). *Clin Cancer Res* 2005;11:7757-7763.
  - 49 Moreno C, Villamor N, Colomer D, Esteve J, Martino R, Nomdedeu J, et al. Allogeneic stem-cell transplantation may overcome the adverse prognosis of unmutated VH gene in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:3433-3438.
  - 50 Montserrat E, Moreno C, Esteve J, Urbano-Ispizua A, Gine E, Bosch F. How I treat refractory CLL. *Blood* 2006;107:1276-1283.

- 51 Houlston RS, Catovsky D, Yuille MR. Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002;16:1008-1014.
- 52 Catovsky D. Definition and diagnosis of sporadic and familial chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18:783-94, vii.
- 53 Auer RL, Dighiero G, Goldin LR, Syndercombe-Court, Jones C, McElwaine S, et al. Trinucleotide repeat dynamic mutation identifying susceptibility in familial and sporadic chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007;136:73-79.
- 54 Sellick GS, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006;33:195-201.
- 55 Ng D, Toure O, Wei MH, Arthur DC, Abbasi F, Fontaine L, et al. Identification of a novel chromosome region, 13q21.33-q22.2, for susceptibility genes in familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109:916-925.
- 56 Horwitz M, Goode EL, Jarvik GP. Anticipation in familial leukemia. *Am J Hum Genet* 1996;59:990-998.
- 57 Frisch B, Bartl R. Histologic classification and staging of chronic lymphocytic leukemia. A retrospective and prospective study of 503 cases. *Acta Haematol* 1988;79:140-152.
- 58 Montserrat E, Rozman C. Bone marrow biopsy in chronic lymphocytic leukemia: a review of its prognostic importance. *Blood Cells* 1987;12:315-326.
- 59 Geisler CH, Hou-Jensen K, Jensen OM, Tinggaard-Pedersen N, Hansen MM, Hansen NE, et al. The bone-marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is not an important prognostic factor. Danish CLL Study Group. *Eur J Haematol* 1996;57:292-300.
- 60 Zengin N, Kars A, Sungur A, Zengin NI, Hayran M, Tekuzman G, et al. The significance of the bone marrow biopsy pattern in chronic lymphocytic leukemia: a prognostic dilemma. *Am J Hematol* 1999;62:208-211.
- 61 Orfao A, Gonzalez M, San Miguel JF, Rios A, Canizo MC, Hernandez J, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia: prognostic value of the immunophenotype and the clinico-haematological features. *Am J Hematol* 1989;31:26-31.
- 62 Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 2003;63:803-843.
- 63 Delgado J, Matutes E, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Rafiq-Mohammed F, et al. Diagnostic significance of CD20 and FMC7 expression in B-cell disorders. *Am J Clin Pathol* 2003;120:754-759.
- 64 Durig J, Naschar M, Schmucker U, Renzing-Kohler K, Holter T, Huttmann A, et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2002;16:30-35.
- 65 Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002;99:1023-1029.
- 66 Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;111:865-873.
- 67 Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia MJ, Houlihan A, Que TH, 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.

- 68 Zucchetto A, Bomben R, Dal BM, Sonogo P, Nanni P, Rupolo M, et al. A scoring system based on the expression of six surface molecules allows the identification of three prognostic risk groups in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Physiol* 2006;207:354-363.
- 69 Chiorazzi N, Allen SL, Ferrarini M. Clinical and laboratory parameters that define clinically relevant B-CLL subgroups. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;294:109-133.
- 70 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines. *Blood* 2008.
- 71 Mauro FR, Foa R, Cerretti R, Giannarelli D, Coluzzi S, Mandelli F, et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood* 2000;95:2786-2792.
- 72 Paolino W, Infelise V, Levis A, Marmont F, Vitolo U, Paolino F, et al. Adenosplenomegaly and prognosis in uncomplicated and complicated chronic lymphocytic leukemia. A study of 362 cases. *Cancer* 1984;54:339-346.
- 73 Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G, et al. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;107:859-861.
- 74 Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Geyer SM, LaPlant BR, Call TG, et al. Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a universally available prognostic test. *Mayo Clin Proc* 2007;82:449-453.
- 75 Muntanola A, Bosch F, Arguis P, Mellano-Rodrigo E, Ayuso C, Gine E, et al. Abdominal computed tomography predicts progression in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2007;25:1576-1580.
- 76 Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996;87:4990-4997.
- 77 Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, Kwok M, Fenton JA, Plummer M, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia 1. *N Engl J Med* 2008;359:575-583.
- 78 De RG, Granati L, Girelli G, Gandolfo G, Arista MC, Martelli M, et al. Incidence and prognostic significance of autoantibodies against erythrocytes and platelets in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Nouv Rev Fr Hematol* 1988;30:403-406.
- 79 De RG, Granati L, Girelli G, Gandolfo G, Perrone P, Martelli M, et al. Prognostic value of autoantibodies against erythrocytes and platelets in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Tumori* 1991;77:100-104.
- 80 Francis S, Karanth M, Pratt G, Starczynski J, Hooper L, Fegan C, et al. The effect of immunoglobulin VH gene mutation status and other prognostic factors on the incidence of major infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2006;107:1023-1033.
- 81 Rozman C, Montserrat E, Vinolas N. Serum immunoglobulins in B-chronic lymphocytic leukemia. Natural history and prognostic significance. *Cancer* 1988;61:279-283.

- 82 Tsimberidou AM, O'Brien S, Khouri I, Giles FJ, Kantarjian HM, Champlin R, et al. Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2006;24:2343-2351.
- 83 Brugiatelli M, Bandini G, Barosi G, Lauria F, Liso V, Marchetti M, et al. Management of chronic lymphocytic leukemia: practice guidelines from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica* 2006;91:1662-1673.
- 84 Oscier D, Fegan C, Hillmen P, Illidge T, Johnson S, Maguire P, et al. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2004;125:294-317.
- 85 Shanafelt TD, Byrd JC, Call TG, Zent CS, Kay NE. Narrative review: initial management of newly diagnosed, early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Ann Intern Med* 2006;145:435-447.
- 86 Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:861-868.
- 87 Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1750-1757.
- 88 Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJ, Bezares RF, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370:230-239.
- 89 Bosch F, Ferrer A, Lopez-Guillermo A, Gine E, Bellosillo B, Villamor N, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;119:976-984.
- 90 Tsimberidou AM, Keating MJ, Giles FJ, Wierda WG, Ferrajoli A, Lerner S, et al. Fludarabine and mitoxantrone for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2004;100:2583-2591.
- 91 Karlsson K, Stromberg M, Liliemark J, Delannoy A, Johnson SA, Porwit A, et al. Oral cladribine for B-cell chronic lymphocytic leukaemia: report of a phase II trial with a 3-d, 3-weekly schedule in untreated and pretreated patients, and a long-term follow-up of 126 previously untreated patients. *Br J Haematol* 2002;116:538-548.
- 92 Schulz H, Klein SK, Rehwald U, Reiser M, Hinke A, Knauf WU, et al. Phase 2 study of a combined immunochemotherapy using rituximab and fludarabine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:3115-3120.
- 93 Kay NE, Geyer SM, Call TG, Shanafelt TD, Zent CS, Jelinek DF, et al. Combination chemoimmunotherapy with pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab shows significant clinical activity with low accompanying toxicity in previously untreated B chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109:405-411.
- 94 Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:4079-4088.
- 95 Wierda W, O'Brien S, Wen S, Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas D, et al. Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for

- relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:4070-4078.
- 96 Pettitt AR, Matutes E, Oscier D. Alemtuzumab in combination with high-dose methylprednisolone is a logical, feasible and highly active therapeutic regimen in chronic lymphocytic leukaemia patients with p53 defects. *Leukemia* 2006;20:1441-1445.
- 97 Thornton PD, Matutes E, Bosanquet AG, Lakhani AK, Grech H, Ropner JE, et al. High dose methylprednisolone can induce remissions in CLL patients with p53 abnormalities. *Ann Hematol* 2003;82:759-765.
- 98 Byrd JC, Lin TS, Dalton JT, Wu D, Phelps MA, Fischer B, et al. Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109:399-404.
- 99 Keating MJ, Rai KR, Wierda WG. Evolution of treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia. Part 2 of a 3-Part series: Advances in the treatment of hematologic malignancies. *Clin Adv Hematol Oncol* 2005;3:1-10.
- 100 O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki A, Koziner B, et al. Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2007;25:1114-1120.
- 101 Kharfan-Dabaja MA, Kumar A, Behera M, Djulbegovic B. Systematic review of high dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia: what is the published evidence? *Br J Haematol* 2007;139:234-242.
- 102 Kharfan-Dabaja MA, Anasetti C, Santos ES. Hematopoietic cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: an evolving concept. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:373-385.
- 103 Gribben JG. Stem-cell transplantation in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:513-527.
- 104 Sorror ML, Maris MB, Sandmaier BM, Storer BE, Stuart MJ, Hegenbart U, et al. Hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for advanced chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:3819-3829.
- 105 Dreger P, Corradini P, Kimby E, Michallet M, Milligan D, Schetelig J, et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 2007;21:12-17.
- 106 Winkler D, Dohner H, Stilgenbauer S. Genetics, gene expression, and targeted therapies in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Drug Targets* 2006;7:1313-1327.
- 107 Rai KR, Wasil T, Iqbal U, Driscoll N, Patel D, Janson D, et al. Clinical staging and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18:795-805, vii.
- 108 Zenz T, Dohner H, Stilgenbauer S. Genetics and risk-stratified approach to therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:439-453.
- 109 Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:455-468.
- 110 Rozman C, Bosch F, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia: a changing natural history? *Leukemia* 1997;11:775-778.
- 111 Jaksic B, Vitale B. Total tumour mass score (TTM): a new parameter in chronic lymphocyte leukaemia. *Br J Haematol* 1981;49:405-413.

- 112 Hannisdal E, Grottum KA, Langmark F. Erythrocyte sedimentation rate as a prognostic factor in chronic lymphocytic leukaemia. *Scand J Haematol* 1986;36:253-257.
- 113 Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do KA, et al. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109:4679-4685.
- 114 Montserrat E. New prognostic markers in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006;279-284.
- 115 Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol* 1989;72:141-149.
- 116 Jaksic B, Vitale B, Hauptmann E, Planinc-Peraica A, Ostojic S, Kusec R. The roles of age and sex in the prognosis of chronic leukaemias. A study of 373 cases. *Br J Cancer* 1991;64:345-348.
- 117 Criel A, Michaux L, De Wolf-Peeters C. The concept of typical and atypical chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 1999;33:33-45.
- 118 Oscier DG, Matutes E, Copplestone A, Pickering RM, Chapman R, Gillingham R, et al. Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol* 1997;98:934-939.
- 119 Vinolas N, Reverter JC, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: an update of its prognostic significance. *Blood Cells* 1987;12:457-470.
- 120 Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;93:1732-1737.
- 121 Knauf WU, Langenmayer I, Ehlers B, Mohr B, Adorf D, Nerl CH, et al. Serum levels of soluble CD23, but not soluble CD25, predict disease progression in early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1997;27:523-532.
- 122 Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1996;88:4259-4264.
- 123 Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M, Marschitz I, Louda N, Hubmann R, et al. The role of soluble CD23 in distinguishing stable and progressive forms of B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002;43:549-554.
- 124 Letilovic T, Vrhovac R, Verstovsek S, Jaksic B, Ferrajoli A. Role of angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2006;107:925-934.
- 125 Shanafelt TD, Kay NE. The clinical and biologic importance of neovascularization and angiogenic signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006;33:174-185.
- 126 Blum KA, Young D, Broering S, Lucas MS, Fischer B, Lin TS, et al. Computed tomography scans do not improve the predictive power of 1996 national cancer institute sponsored working group chronic lymphocytic leukemia response criteria  
3. *J Clin Oncol* 2007;25:5624-5629.

- 127 Morabito F, Damle RN, Deaglio S, Keating M, Ferrarini M, Chiorazzi N. The CD38 ectoenzyme family: advances in basic science and clinical practice. *Mol Med* 2006;12:342-344.
- 128 Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Ferrero E, Malavasi F. In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;108:1135-1144.
- 129 Domingo-Domenech E, Domingo-Claros A, Gonzalez-Barca E, Beneitez D, Alonso E, Romagosa V, et al. CD38 expression in B-chronic lymphocytic leukemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. *Haematologica* 2002;87:1021-1027.
- 130 Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strola G, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* 2003;101:1262-1269.
- 131 Gentile M, Mauro FR, Calabrese E, De Propriis MS, Giammartini E, Mancini F, et al. The prognostic value of CD38 expression in chronic lymphocytic leukaemia patients studied prospectively at diagnosis: a single institute experience. *Br J Haematol* 2005;130:549-557.
- 132 Mainou-Fowler T, Dignum HM, Proctor SJ, Summerfield GP. The prognostic value of CD38 expression and its quantification in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk Lymphoma* 2004;45:455-462.
- 133 Matrai Z. CD38 as a prognostic marker in CLL. *Hematology* 2005;10:39-46.
- 134 Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004;363:105-111.
- 135 Orchard J, Ibbotson R, Best G, Parker A, Oscier D. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leuk Lymphoma* 2005;46:1689-1698.
- 136 Oscier D. Biology and prognostic factors in CLL. *Hematology* 2005;10 Suppl 1:197-199.
- 137 Krober A, Bloehdorn J, Hafner S, Buhler A, Seiler T, Kienle D, et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006;24:969-975.
- 138 Del G, I, Morilla A, Osuji N, Matutes E, Morilla R, Burford A, et al. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2005;104:2124-2132.
- 139 Durig J, Nuckel H, Cremer M, Fuhrer A, Halfmeyer K, Fandrey J, et al. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003;17:2426-2434.
- 140 Best OG, Ibbotson RE, Parker AE, Davis ZA, Orchard JA, Oscier DG. ZAP-70 by flow cytometry: a comparison of different antibodies, anticoagulants, and methods of analysis. *Cytometry B Clin Cytom* 2006;70:235-241.
- 141 Carreras J, Villamor N, Colomo L, Moreno C, Cajal S, Crespo M, et al. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J Pathol* 2005;205:507-513.
- 142 Letestu R, Rawstron A, Ghia P, Villamor N, Leuven NB, Boettcher S, et al. Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: A multicentric international harmonization process. *Cytometry B Clin Cytom* 2006;70:309-314.

- 143 D'Arena G, Tarnani M, Rumi C, Vaisitti T, Aydin S, De FR, et al. Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2007.
- 144 Zucchetto A, Bomben R, Bo MD, Nanni P, Bulian P, Rossi FM, et al. ZAP-70 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: evaluation by external (isotypic) or internal (T/NK cells) controls and correlation with IgV(H) mutations. *Cytometry B Clin Cytom* 2006;70:284-292.
- 145 Van BF, Janssens A, Piette A, Callewaert F, Pede V, Offner F, et al. Kolmogorov-Smirnov statistical test for analysis of ZAP-70 expression in B-CLL, compared with quantitative PCR and IgV(H) mutation status. *Cytometry B Clin Cytom* 2006;70:302-308.
- 146 Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002;99:1023-1029.
- 147 Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Bottcher S, Ghia P, Zehnder JL, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2007;21:956-964.
- 148 Kim SZ, Chow KU, Kukoc-Zivojnov N, Boehrer S, Brieger A, Steimle-Grauer SA, et al. Expression of ZAP-70 protein correlates with disease stage in chronic lymphocytic leukemia and is associated with, but not generally restricted to, non-mutated Ig VH status. *Leuk Lymphoma* 2004;45:2037-2045.
- 149 Munoz L, Lasa A, Carricondo MT, Hernandez C, Ubeda J, Nomdedeu JF. Comparative analysis of ZAP-70 expression and Ig VH mutational status in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:96-102.
- 150 Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stilgenbauer S, Stevenson F, et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007;21:1-3.
- 151 Maloum K, Davi F, Merle-Beral H, Pritsch O, Magnac C, Vuillier F, et al. Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000;96:377-379.
- 152 Herve M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest* 2005;115:1636-1643.
- 153 Messmer BT, Albesiano E, Messmer D, Chiorazzi N. The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. *Blood* 2004;103:3490-3495.
- 154 Bomben R, Dal BM, Zucchetto A, Zaina E, Nanni P, Sonogo P, et al. Mutational status of IgV(H) genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia and prognosis: percent mutations or antigen-driven selection? *Leukemia* 2005;19:1490-1492.
- 155 Pekova S, Baran-Marszak F, Schwarz J, Matoska V. Mutated or non-mutated? Which database to choose when determining the IgVH hypermutation status in chronic lymphocytic leukemia? *Haematologica* 2006;91:ELT01.
- 156 Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005;105:1678-1685.

- 157 Falt S, Merup M, Tobin G, Thunberg U, Gahrton G, Rosenquist R, et al. Distinctive gene expression pattern in VH3-21 utilizing B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005;106:681-689.
- 158 Thorselius M, Krober A, Murray F, Thunberg U, Tobin G, Buhler A, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood* 2006;107:2889-2894.
- 159 Donisi PM, Di LN, Riccardi M, Paparella A, Sarpellon C, Zupo S, et al. Pattern and distribution of immunoglobulin VH gene usage in a cohort of B-CLL patients from a Northeastern region of Italy. *Diagn Mol Pathol* 2006;15:206-215.
- 160 Panovska-Stavridis I, Ivanovski M, Siljanovski N, Cevreska L, Efremov DG. Chronic lymphocytic leukemia patients with a V1-69 gene rearrangement do not have inferior survival with respect to patients that express other unmutated V(H) genes. *Leuk Res* 2007;31:245-248.
- 161 Ritgen M, Lange A, Stilgenbauer S, Dohner H, Bertscher C, Bosse H, et al. Unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status remains an adverse prognostic factor after autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003;101:2049-2053.
- 162 Ritgen M, Stilgenbauer S, von NN, Humpe A, Bruggemann M, Pott C, et al. Graft-versus-leukemia activity may overcome therapeutic resistance of chronic lymphocytic leukemia with unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status: implications of minimal residual disease measurement with quantitative PCR. *Blood* 2004;104:2600-2602.
- 163 Matthews C, Catherwood MA, Morris TC, Alexander HD. V(H)3-48 and V(H)3-53, as well as V(H)3-21, gene rearrangements define unique subgroups in CLL and are associated with biased lambda light chain restriction, homologous LCDR3 sequences and poor prognosis. *Leuk Res* 2007;31:231-234.
- 164 Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1410-1416.
- 165 Stilgenbauer S, Dohner H. Molecular genetics and its clinical relevance. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18:827-48, viii.
- 166 Stilgenbauer S, Dohner H. Genotypic prognostic markers. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;294:147-164.
- 167 Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, Wildenberger K, Bentz M, Dohner K, et al. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1999;13:1331-1334.
- 168 Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De AC, Veronese A, Cavazzini F, et al. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* 2004;18:476-483.
- 169 Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997;89:2516-2522.
- 170 Dickinson JD, Smith LM, Sanger WG, Zhou G, Townley P, Lynch JC, et al. Unique gene expression and clinical characteristics are associated with the 11q23 deletion in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005;128:460-471.

- 171 Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995;85:1580-1589.
- 172 Pittman S, Catovsky D. Prognostic significance of chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1984;58:649-660.
- 173 Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, et al. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998;91:4342-4349.
- 174 Hernandez JM, Mecucci C, Criel A, Meeus P, Michaux I, Van HA, et al. Cytogenetic analysis of B cell chronic lymphoid leukemias classified according to morphologic and immunophenotypic (FAB) criteria. *Leukemia* 1995;9:2140-2146.
- 175 Amiel A, Leopold L, Gronich N, Yukla M, Fejgin MD, Lishner M. The influence of different chromosomal aberrations on molecular cytogenetic parameters in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;167:145-149.
- 176 Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Tsompanakou A, Gaitatzi M, Kalogiannidis P, Anagnostopoulos A, et al. Clinical, immunophenotypic, and molecular profiling of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia and comparison with other karyotypic subgroups defined by cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;168:109-119.
- 177 Del Principe MI, Del PG, Venditti A, Buccisano F, Maurillo L, Marini R, et al. Clinical significance of soluble p53 protein in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2004;89:1468-1475.
- 178 Dickinson JD, Gilmore J, Iqbal J, Sanger W, Lynch JC, Chan J, et al. 11q22.3 deletion in B-chronic lymphocytic leukemia is specifically associated with bulky lymphadenopathy and ZAP-70 expression but not reduced expression of adhesion/cell surface receptor molecules. *Leuk Lymphoma* 2006;47:231-244.
- 179 Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, Neuberg DS, Reed JC, Kitada S, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol* 2007;25:799-804.
- 180 Sindelarova L, Michalova K, Zemanova Z, Ransdorfova S, Brezinova J, Pekova S, et al. Incidence of chromosomal anomalies detected with FISH and their clinical correlations in B-chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;160:27-34.
- 181 Wlodarska I, Matthews C, Veyt E, Pospisilova H, Catherwood MA, Poulsen TS, et al. Telomeric IGH losses detectable by fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia reflect somatic VH recombination events. *J Mol Diagn* 2007;9:47-54.
- 182 Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;107:742-751.
- 183 Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, Tobin G, Aleskog A, Thunberg U, et al. Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 2005;105:4807-4812.
- 184 Hultdin M, Rosenquist R, Thunberg U, Tobin G, Norrback KF, Johnson A, et al. Association between telomere length and V(H) gene mutation status in chronic lymphocytic leukaemia: clinical and biological implications. *Br J Cancer* 2003;88:593-598.

- 185 Guarini A, Gaidano G, Mauro FR, Capello D, Mancini F, De Propriis MS, et al. Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features. *Blood* 2003;102:1035-1041.
- 186 Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, Oppezco P, Magnac C, Michel A, et al. Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21:3928-3932.
- 187 Seiler T, Dohner H, Stilgenbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006;33:186-194.
- 188 Thunberg U, Johnson A, Roos G, Thorn I, Tobin G, Sallstrom J, et al. CD38 expression is a poor predictor for VH gene mutational status and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;97:1892-1894.
- 189 Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:893-901.
- 190 Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, 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.
- 191 van't Veer MB, Brooijmans AM, Langerak AW, Verhaaf B, Goudswaard CS, Graveland WJ, et al. The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006;91:56-63.
- 192 Heintel D, Kienle D, Shehata M, Krober A, Kroemer E, Schwarzingler I, et al. High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005;19:1216-1223.
- 193 Bilban M, Heintel D, Scharl T, Woelfel T, Auer MM, Porpaczy E, et al. Deregulated expression of fat and muscle genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia with high lipoprotein lipase expression. *Leukemia* 2006;20:1080-1088.
- 194 Buhl AM, Jurlander J, Geisler CH, Pedersen LB, Andersen MK, Josefsson P, et al. CLLU1 expression levels predict time to initiation of therapy and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2006;76:455-464.
- 195 Josefsson P, Geisler CH, Leffers H, Petersen JH, Andersen MK, Jurlander J, et al. CLLU1 expression analysis adds prognostic information to risk prediction in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109:4973-4979.
- 196 Chang CC, Lorek J, Sabath DE, Li Y, Chitambar CR, Logan B, et al. Expression of MUM1/IRF4 correlates with clinical outcome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:4671-4675.
- 197 Kalla C, Scheuermann MO, Kube I, Schlotter M, Mertens D, Dohner H, et al. Analysis of 11q22-q23 deletion target genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: Evidence for a pathogenic role of NPAT, CUL5, and PPP2R1B. *Eur J Cancer* 2007.
- 198 Winkler D, Schneider C, Krober A, Pasqualucci L, Lichter P, Dohner H, et al. Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 2005;19:1211-1215.
- 199 Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 2006;108:3152-3160.
- 200 Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004;103:4389-4395.

- 201 Angelopoulou MK, Kontopidou FN, Pangalis GA. Adhesion molecules in B-chronic lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol* 1999;36:178-197.
- 202 Hajdu M, Sebestyen A, Barna G, Reiniger L, Janosi J, Sreter L, et al. Activity of the notch-signalling pathway in circulating human chronic lymphocytic leukaemia cells. *Scand J Immunol* 2007;65:271-275.
- 203 Nuckel H, Frey UH, Durig J, Duhrsen U, Siffert W. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene 677C>T and 1298A>C polymorphisms are associated with differential apoptosis of leukemic B cells in vitro and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2004;18:1816-1823.
- 204 Raval A, Tanner SM, Byrd JC, Angerman EB, Perko JD, Chen SS, et al. Downregulation of Death-Associated Protein Kinase 1 (DAPK1) in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell* 2007;129:879-890.
- 205 Raval A, Lucas DM, Matkovic JJ, Bennett KL, Liyanarachchi S, Young DC, et al. TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:3877-3885.
- 206 Redondo-Munoz J, Escobar-Diaz E, Samaniego R, Terol MJ, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* 2006;108:3143-3151.
- 207 Rodriguez A, Martinez N, Camacho FI, Ruiz-Ballesteros E, Algara P, Garcia JF, et al. Variability in the degree of expression of phosphorylated I kappa B alpha in chronic lymphocytic leukemia cases with nodal involvement. *Clin Cancer Res* 2004;10:6796-6806.
- 208 Ryan EP, Pollock SJ, Kaur K, Felgar RE, Bernstein SH, Chiorazzi N, et al. Constitutive and activation-inducible cyclooxygenase-2 expression enhances survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Clin Immunol* 2006;120:76-90.
- 209 Sembries S, Pahl H, Stilgenbauer S, Dohner H, Schriever F. Reduced expression of adhesion molecules and cell signaling receptors by chronic lymphocytic leukemia cells with 11q deletion. *Blood* 1999;93:624-631.
- 210 Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004;103:1202-1210.
- 211 Soma LA, Craig FE, Swerdlow SH. The proliferation center microenvironment and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Hum Pathol* 2006;37:152-159.
- 212 Vuillier F, Dumas G, Magnac C, Prevost MC, Lalanne AI, Oppezio P, et al. Lower levels of surface B-cell-receptor expression in chronic lymphocytic leukemia are associated with glycosylation and folding defects of the mu and CD79a chains. *Blood* 2005;105:2933-2940.
- 213 Ebert BL, Golub TR. Genomic approaches to hematologic malignancies. *Blood* 2004;104:923-932.
- 214 Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di LG, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;353:1793-1801.
- 215 Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004;350:1605-1616.

- 216 Alvarez P, Saenz P, Arteta D, Martinez A, Pocovi M, Simon L, et al. Transcriptional profiling of hematologic malignancies with a low-density DNA microarray. *Clin Chem* 2007;53:259-267.
- 217 Chng WJ, Schop RF, Price-Troska T, Ghobrial I, Kay N, Jelinek DF, et al. Gene-expression profiling of Waldenstrom macroglobulinemia reveals a phenotype more similar to chronic lymphocytic leukemia than multiple myeloma. *Blood* 2006;108:2755-2763.
- 218 Dunphy CH. Gene expression profiling data in lymphoma and leukemia: review of the literature and extrapolation of pertinent clinical applications. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:483-520.
- 219 Gutierrez NC, Lopez-Perez R, Hernandez JM, Isidro I, Gonzalez B, Delgado M, et al. Gene expression profile reveals deregulation of genes with relevant functions in the different subclasses of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005;19:402-409.
- 220 Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* 2004;351:533-542.
- 221 Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 2006;354:2419-2430.
- 222 Margalit O, Somech R, Amariglio N, Rechavi G. Microarray-based gene expression profiling of hematologic malignancies: basic concepts and clinical applications. *Blood Rev* 2005;19:223-234.
- 223 Staal FJ, Cario G, Cazzaniga G, Haferlach T, Heuser M, Hofmann WK, et al. Consensus guidelines for microarray gene expression analyses in leukemia from three European leukemia networks. *Leukemia* 2006;20:1385-1392.
- 224 Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, Boer JM, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004;350:1617-1628.
- 225 Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639-1647.
- 226 Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194:1625-1638.
- 227 Ferrer A, Ollila J, Tobin G, Nagy B, Thunberg U, Aalto Y, et al. Different gene expression in immunoglobulin-mutated and immunoglobulin-unmutated forms of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;153:69-72.
- 228 Vasconcelos Y, De VJ, Vallat L, Reme T, Lalanne AI, Wanherdrick K, et al. Gene expression profiling of chronic lymphocytic leukemia can discriminate cases with stable disease and mutated Ig genes from those with progressive disease and unmutated Ig genes. *Leukemia* 2005;19:2002-2005.
- 229 Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, 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.
- 230 Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P, Kraut N, et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia

- subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol* 2004;22:3937-3949.
- 231 Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, Salvi T, Wrobel G, Radlwimmer B, et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:1039-1044.
- 232 Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, Azzalin G, Carucci N, Tavolaro S, et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109:4944-4951.
- 233 Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin Oncol* 2006;33:167-173.
- 234 Rush LJ, Raval A, Funchain P, Johnson AJ, Smith L, Lucas DM, et al. Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. *Cancer Res* 2004;64:2424-2433.
- 235 Raval A, Tanner SM, Byrd JC, Angerman EB, Perko JD, Chen SS, et al. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2007;129:879-890.
- 236 Nelson BP, Gupta R, Dewald GW, Paternoster SF, Rosen ST, Peterson LC. Chronic lymphocytic leukemia FISH panel: impact on diagnosis. *Am J Clin Pathol* 2007;128:323-332.
- 237 Burkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007.
- 238 Sellick GS, Goldin LR, Wild RW, Slager SL, Ressenti L, Strom SS, et al. A high-density SNP genome-wide linkage search of 206 families identifies susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007.
- 239 Rodriguez A, Villuendas R, Yanez L, Gomez ME, Diaz R, Pollan M, et al. Molecular heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia is dependent on BCR signaling: clinical correlation. *Leukemia* 2007;21:1984-1991.
- 240 Hewamana S, Alghazal S, Lin TT, Clement M, Jenkins C, Guzman ML, et al. The NF-kappaB subunit Rel A is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukemia and represents a promising therapeutic target  
3. *Blood* 2008;111:4681-4689.
- 241 Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers  
1. *Blood* 2008.
- 242 Cheson BD, Bennett JM, Rai KR, Grever MR, Kay NE, Schiffer CA, et al. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the National Cancer Institute-sponsored working group 8. *Am J Hematol* 1988;29:152-163.
- 243 Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25:579-586.
- 244 Gonzalez MB, Hernandez JM, Garcia JL, Lumbreras E, Castellanos M, Hernandez JM, et al. The value of fluorescence in situ hybridization for the detection of 11q in multiple myeloma. *Haematologica* 2004;89:1213-1218.
- 245 Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 1970;60:315-319.

- 246 Stevenson F, Sahota S, Zhu D, Ottensmeier C, Chapman C, Oscier D, et al. Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev* 1998;162:247-259.
- 247 van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-2317.
- 248 Linke B, Bolz I, Fayyazi A, von Hofen M, Pott C, Bertram J, et al. Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobulin heavy chain genes. *Leukemia* 1997;11:1055-1062.
- 249 Lopez-Perez R, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Balanzategui A, Chillón MC, Alaejos I, et al. Gene scanning of VDJH-amplified segments is a clinically relevant technique to detect contaminating tumor cells in the apheresis products of multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:665-672.
- 250 Cook GP, Tomlinson IM. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol Today* 1995;16:237-242.
- 251 Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, et al. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med* 1998;188:2151-2162.
- 252 Cook GP, Tomlinson IM. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol Today* 1995;16:237-242.
- 253 Matsuda F, Shin EK, Nagaoka H, Matsumura R, Haino M, Fukita Y, et al. Structure and physical map of 64 variable segments in the 3'0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Nat Genet* 1993;3:88-94.
- 254 Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 2008;22:211-219.
- 255 Auer RL, Riaz S, Cotter FE. The 13q and 11q B-cell chronic lymphocytic leukaemia-associated regions derive from a common ancestral region in the zebrafish. *Br J Haematol* 2007;137:443-453.
- 256 Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, Jenkins RB, Paternoster SF, Smoley SA, 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.
- 257 Dohner H, Pohl S, Bulgay-Morschel M, Stilgenbauer S, Bentz M, Lichter P. Trisomy 12 in chronic lymphoid leukemias--a metaphase and interphase cytogenetic analysis. *Leukemia* 1993;7:516-520.
- 258 Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100:1177-1184.
- 259 Hamblin TJ, Davis ZA, Oscier DG. Determination of how many immunoglobulin variable region heavy chain mutations are allowable in unmutated chronic lymphocytic leukaemia - long-term follow up of patients with different percentages of mutations  
1. *Br J Haematol* 2008;140:320-323.

- 260 Bomben R, Dal BM, Capello D, Benedetti D, Marconi D, Zucchetto A, et al. Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study. *Blood* 2007;109:2989-2998.
- 261 Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping  
7. *Leukemia* 2007;21:2442-2451.
- 262 Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia  
4. *Br J Haematol* 2003;121:287-295.
- 263 Caporaso N, Goldin L, Plass C, Calin G, Marti G, Bauer S, et al. Chronic lymphocytic leukaemia genetics overview  
20. *Br J Haematol* 2007;139:630-634.
- 264 Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, et al. Tc11 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181  
3. *Cancer Res* 2006;66:11590-11593.
- 265 Bosch F, Muntanola A, Gine E, Carrio A, Villamor N, Moreno C, et al. Clinical implications of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2006;70:214-217.
- 266 Hauswirth AW, Jager U. Impact of cytogenetic and molecular prognostic markers on the clinical management of chronic lymphocytic leukemia  
3. *Haematologica* 2008;93:14-19.
- 267 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group  
4. *J Clin Pathol* 1989;42:567-584.
- 268 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol* 1989;42:567-584.
- 269 De AC, Gandini D, Cuneo A, Moretti S, Bigoni R, Roberti MG, et al. BCL-1 rearrangements and p53 mutations in atypical chronic lymphocytic leukemia with t(11;14)(q13;q32)  
9. *Haematologica* 2000;85:913-921.
- 270 Martin-Subero JI, Ibbotson R, Klapper W, Michaux L, Callet-Bauchu E, Berger F, et al. A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant BCL3-translocation. *Leukemia* 2007;21:1532-1544.
- 271 Van Den NE, Robin V, Francart J, Hagemeyer A, Stul M, Vandenberghe P, et al. Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine  
4. *Leukemia* 2007;21:1715-1722.
- 272 Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG, Harder L, Nowak R, Arriola EL, et al. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* 2001;98:3413-3420.

- 273 Kuppers R, Sonoki T, Satterwhite E, Gesk S, Harder L, Oscier DG, et al. Lack of somatic hypermutation of IG V(H) genes in lymphoid malignancies with t(2;14)(p13;q32) translocation involving the BCL11A gene. *Leukemia* 2002;16:937-939.
- 274 Kuppers R, Sonoki T, Satterwhite E, Gesk S, Harder L, Oscier DG, et al. Lack of somatic hypermutation of IG V(H) genes in lymphoid malignancies with t(2;14)(p13;q32) translocation involving the BCL11A gene. *Leukemia* 2002;16:937-939.
- 275 Sonoki T, Harder L, Horsman DE, Karran L, Taniguchi I, Willis TG, et al. Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies 4. *Blood* 2001;98:2837-2844.
- 276 Shaughnessy J, Jr., Gabrea A, Qi Y, Brents L, Zhan F, Tian E, et al. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma 2. *Blood* 2001;98:217-223.
- 277 Costes V, Duchayne E, Taib J, Delfour C, Rousset T, Baldet P, et al. Intrasinusoidal bone marrow infiltration: a common growth pattern for different lymphoma subtypes 10. *Br J Haematol* 2002;119:916-922.
- 278 Hayette S, Tigaud I, Callet-Bauchu E, Ffrench M, Gazzo S, Wahbi K, et al. In B-cell chronic lymphocytic leukemias, 7q21 translocations lead to overexpression of the CDK6 gene 20. *Blood* 2003;102:1549-1550.
- 279 Criel A, Verhoef G, Vlietinck R, Mecucci C, Billiet J, Michaux L, et al. Further characterization of morphologically defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases 5. *Br J Haematol* 1997;97:383-391.
- 280 Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities 4. *N Engl J Med* 1990;323:720-724.
- 281 Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, Benner A, Leupolt E, Winkler D, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* 2007;92:1242-1245.
- 282 Aalto Y, El-Rifa W, Vilpo L, Ollila J, Nagy B, Vihinen M, et al. Distinct gene expression profiling in chronic lymphocytic leukemia with 11q23 deletion. *Leukemia* 2001;15:1721-1728.
- 283 Fernandez V, Jares P, Salaverria I, Gine E, Bea S, Aymerich M, et al. Gene expression profile and genomic changes in disease progression of early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2008;93:132-136.
- 284 Kujawski L, Ouillette P, Erba H, Saddler C, Jakubowiak A, Kaminski M, et al. Genomic complexity identifies patients with aggressive chronic lymphocytic leukemia 1. *Blood* 2008.
- 285 Ouillette P, Erba H, Kujawski L, Kaminski M, Shedden K, Malek SN. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14 2. *Cancer Res* 2008;68:1012-1021.

- 286 Smal C, Lisart S, Maerevoet M, Ferrant A, Bontemps F, Van Den NE. Pharmacological inhibition of the MAPK/ERK pathway increases sensitivity to 2-chloro-2'-deoxyadenosine (CdA) in the B-cell leukemia cell line EHEB 1. *Biochem Pharmacol* 2007;73:351-358.
- 287 Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather 1. *J Clin Oncol* 1999;17:399-408.
- 288 Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death 4. *Physiol Rev* 2007;87:99-163.
- 289 Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways 223. *Nat Cell Biol* 2001;3:E255-E263.
- 290 Lao Y, Chang DC. Study of the functional role of Bcl-2 family proteins in regulating Ca(2+) signals in apoptotic cells. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1038-1039.
- 291 Bernardi P, Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem* 2007;45:481-506.
- 292 McClintock DS, Santore MT, Lee VY, Brunelle J, Budinger GR, Zong WX, et al. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death 5. *Mol Cell Biol* 2002;22:94-104.
- 293 Shchepina LA, Pletjushkina OY, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Fetisova EK, Izyumov DS, et al. Oligomycin, inhibitor of the F0 part of H<sup>+</sup>-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis 7. *Oncogene* 2002;21:8149-8157.
- 294 Faderl S, Rai K, Gribben J, Byrd JC, Flinn IW, O'Brien S, et al. Phase II study of single-agent bortezomib for the treatment of patients with fludarabine-refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia 39. *Cancer* 2006;107:916-924.
- 295 Bustelo XR. Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* 2000;20:1461-1477.
- 296 Barragan M, Bellosillo B, Campas C, Colomer D, Pons G, Gil J. Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells 26. *Blood* 2002;99:2969-2976.
- 297 Jones DT, Ganeshaguru K, Anderson RJ, Jackson TR, Bruckdorfer KR, Low SY, et al. Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil- and radiation-induced apoptosis 59. *Blood* 2003;101:3174-3180.
- 298 Cuni S, Perez-Aciego P, Perez-Chacon G, Vargas JA, Sanchez A, Martin-Saavedra FM, et al. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells 2. *Leukemia* 2004;18:1391-1400.
- 299 Ringshausen I, Schneller F, Bogner C, Hipp S, Duyster J, Peschel C, et al. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta 16. *Blood* 2002;100:3741-3748.
- 300 Wu J, Katzav S, Weiss A. A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95vav activity 5. *Mol Cell Biol* 1995;15:4337-4346.

- 301 Turner M, Billadeau DD. VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors  
3. *Nat Rev Immunol* 2002;2:476-486.
- 302 Inabe K, Ishiai M, Scharenberg AM, Freshney N, Downward J, Kurosaki T. Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation  
12. *J Exp Med* 2002;195:189-200.
- 303 Caloca MJ, Zugaza JL, Matallanas D, Crespo P, Bustelo XR. Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1  
5. *EMBO J* 2003;22:3326-3336.
- 304 Caloca MJ, Zugaza JL, Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F, Bustelo XR. F-actin-dependent translocation of the Rap1 GDP/GTP exchange factor RasGRP2  
7. *J Biol Chem* 2004;279:20435-20446.

## **8. Anexos**