

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Nuevas aportaciones de la hibridación in situ fluorescente y el estado mutacional del gen de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas para predecir el curso clínico de los pacientes con leucemia linfocítica crónica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Isabel González Gascón y Marín**

DIRECTORES

**José Ángel Hernández Rivas**  
**Luis Antonio Álvarez-Sala Walther**

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



Nuevas aportaciones de la hibridación *in situ* fluorescente y el estado mutacional del gen de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas para predecir el curso clínico de los pacientes con leucemia linfocítica crónica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR  
Isabel González Gascón y Marín

DIRECTORES  
José Ángel Hernández Rivas  
Luis Antonio Álvarez-Sala Walther

Madrid, 2017

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS**  
**MÉDICO-QUIRÚRGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**Nuevas aportaciones de la hibridación *in situ* fluorescente y el estado mutacional del gen de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas para predecir el curso clínico de los pacientes con leucemia linfocítica crónica**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR**

**Isabel González Gascón y Marín**

**DIRECTORES**

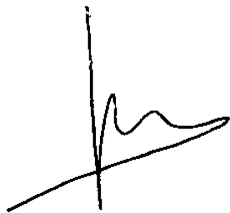
**José Ángel Hernández Rivas**

**Luis Antonio Álvarez-Sala Walther**

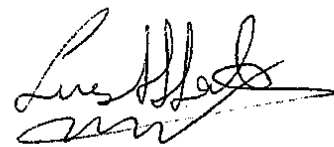
**Madrid, 2017**



Los profesores abajo firmantes certifican que:  
Este trabajo de investigación presentado por  
Doña Isabel González Gascón y Marín  
cumple los requisitos para ser presentado como  
Tesis Doctoral en el formato de Tesis por publicaciones y puede ser enviado para su  
aceptación en el Departamento de Medicina y, en su caso, para su presentación y defensa  
ante el tribunal que designe el Departamento.



**José Ángel Hernández Rivas**  
Profesor asociado de Medicina



**Luis Antonio Álvarez-Sala Walther**  
Profesor titular de Medicina



*A mi familia, por su apoyo incondicional*



“Haced todo lo vuestro con amor”

*1 Co 16, 14*



# RESUMEN



## Introducción

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una enfermedad con un curso clínico extremadamente variable. Por este motivo, con el objetivo de predecir qué pacientes van a progresar en poco tiempo, en las últimas décadas se han identificado varios factores pronósticos de gran relevancia. Entre ellos, el estado mutacional de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGHV*) y las anomalías citogenéticas detectadas por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se han consolidado como dos de los más potentes. Además, en algunos casos indican la necesidad de un abordaje terapéutico diferente. En relación con el estado mutacional *IGHV*, el patrón no mutado se observa en aproximadamente la mitad de los pacientes con LLC y normalmente se caracteriza por presentar una enfermedad agresiva, al contrario que el patrón mutado. La FISH es capaz de detectar alteraciones genéticas clonales en aproximadamente el 80% de los sujetos con LLC. Estas alteraciones son, por orden de frecuencia: deleción de 13q (13q-), deleción de 11q (11q-), trisomía 12 (+12) y deleción de 17p (17p-), las cuales, junto a la ausencia de anomalías citogenéticas, definen cinco grupos con pronóstico distinto. Además, el porcentaje de pérdidas en los casos de 11q-, 13q- y 17p- también tiene valor pronóstico, de tal modo que los enfermos con un porcentaje elevado de células con deleción son los que presentan una evolución peor.

## Objetivos, material, métodos y resultados

El objetivo de esta Tesis Doctoral es analizar el impacto pronóstico de aspectos concretos y novedosos acerca del estado mutacional *IGHV* y de la FISH en pacientes con LLC. Se presentan a continuación los resúmenes de las publicaciones que han dado lugar a esta Tesis.

### Artículo 1. Mutation Status and Immunoglobulin Gene Rearrangements in Patients from Northwest and Central Region of Spain with Chronic Lymphocytic Leukemia

En el primer trabajo se investigó el estado mutacional y las familias y segmentos génicos de VH utilizados en 224 individuos con LLC procedentes de la región central y noroeste de España. El perfil mutado se detectó en el 55,8% de casos. Estos enfermos presentaron mejor supervivencia global (SG), y tiempo hasta primer tratamiento (TPT) que los de perfil no mutado, y presentaron más frecuentemente 13q- y ausencia de CD38. En los no mutados la expresión de CD38 y las alteraciones citogenéticas en 11q-, +12, 17p- fueron

más comunes. La familia más usada fue VH3 seguida de VH1 y VH4, y los segmentos VH3-30, VH1-69 y VH3-23, los más prevalentes. VH1-69 se asoció con un perfil no mutado, una alta probabilidad de recibir tratamiento y peor SG. Los enfermos con VH3-11 también presentaron supervivencia peor, además de anomalías citogenéticas de riesgo alto. En los pacientes con VH5-51 se observó una tendencia a SG corta y a presentar perfil no mutado. VH3-21 se detectó en un porcentaje bajo de enfermos, se asoció con el perfil mutado y una tendencia a un TPT inferior.

## **Artículo 2. A High Proportion of Cells Carrying Trisomy 12 is Associated with a Worse Outcome in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia**

En este segundo estudio se seleccionaron los casos con +12 de la base de datos del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH) y Grupo Español de Leucemia Linfocítica Crónica (GELLC). Se investigó cuál era el mejor porcentaje de células con trisomía capaz de discriminar a los pacientes con +12 en subgrupos pronósticos, y se evidenció el 60% como el más adecuado. El 38,8% de los casos presentó la trisomía en  $\geq 60\%$  de las células. Estos pacientes tuvieron TPT y SG peor que los casos con +12 en  $< 60\%$ . Además, en el análisis multivariado el TPT mantuvo la significación estadística. Las otras variables con efecto en el TPT fueron: tener síntomas B, los estadios clínicos avanzados según la clasificación de Binet, la existencia de adenopatías, esplenomegalia, linfocitosis, las pérdidas en 11q, y el aumento de la  $\beta 2$ -microglobulina (B2M) y de la LDH séricas. Las variables asociadas con una SG peor en el análisis multivariado fueron: el estadio clínico avanzado, las alteraciones en 11q y los niveles altos de B2M.

## **Artículo 3. Characterizing Patients with Multiple Chromosomal Aberrations Detected by FISH in Chronic Lymphocytic Leukemia**

En el tercer artículo se seleccionaron los 323 pacientes con alteraciones múltiples (AM) por FISH de la base de datos del GCECGH y GELLC. La frecuencia de AM fue de 15,4%, y en la mayoría de los casos (63%), las AM estaban presentes desde el diagnóstico. La distribución de las combinaciones fue heterogénea, de tal modo que la asociación más frecuente fue 13q- con 11q- (32,4%), seguida de 13q- con 17p- (25,9%), 13q- con +12 (15,9%), FISH-complejo (9,6%), +12 con 17p- (8,3%), +12 con 11q- (4,1%), y 11q- con 17p- (3,8%). En los pacientes con combinaciones que incluían 17p-, esta delección aparecía como un clon minoritario lo que sugería que pudiera tratarse de un evento genético tardío, a

diferencia de 13q- o +12. El análisis de supervivencia se realizó en los casos con AM desde el diagnóstico. La mediana de TPT en los pacientes con AM fue 27 meses y la SG 76 meses. Dentro de los casos con AM, el TPT más prolongado se observó en la combinación +12 y 13q-. La SG en los enfermos con AM que contenían 17p- fue menor que la de los que no presentaron alteraciones en 17p-. Los pacientes con FISH-complejo fueron los de SG peor seguidos de los pacientes con 17p- y otra alteración y los pacientes con dos alteraciones sin 17p-.

#### **Artículo 4. Hyperdiploidy as a Rare Event that Accompanies Poor Prognosis Markers in CLL**

En el último trabajo se analizó la frecuencia e implicaciones pronósticas de la hiperdiploidía en la LLC. Para ello, se utilizó la base de datos del Hospital Universitario de Salamanca. Se identificaron 8 casos con hiperdiploidía (0,59%), y la mayoría la presentaron desde el diagnóstico. El estado mutacional *IGHV*, disponible en el 57% de los casos, fue en todos ellos no mutado. Se detectaron alteraciones cromosómicas adicionales en 57% de los pacientes, que incluyeron: 17p- (2 casos), 11q- y alteración *IGH* (1 caso) y 13q- e *IGH* (1 caso). En un paciente se observó una mutación *TP53* con una carga mutacional del 95%, sin 17p-. Se requirió tratamiento en 86% de los pacientes, con una mediana de TPT de 1,4 meses. La mediana de SG desde el momento del diagnóstico fue de 66 meses, y desde el momento de la adquisición de la hiperdiploidía de 20 meses. Tanto el TPT como la SG fueron significativamente inferiores a las de los pacientes sin hiperdiploidía.

#### **Conclusiones**

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral aportan aspectos novedosos acerca del estado mutacional *IGHV* y la FISH. Respecto al estado mutacional *IGHV*, se confirmó que los pacientes con perfil mutado tienen mejor pronóstico que los no mutados, y se observó que los segmentos VH3-11 y VH5-51 se asocian con mal pronóstico. En relación a la FISH, este trabajo pone en evidencia tres factores que aportan un pronóstico malo a los pacientes con LLC: (a) presentar un porcentaje  $\geq$  a 60% de células con +12; (b) las alteraciones múltiples por FISH cuando se manifiestan desde el momento del diagnóstico; y (c) la hiperdiploidía, pese a que es un hallazgo muy inusual.



# SUMMARY



## Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a neoplasm with an extremely variable clinical course. For this reason, in the last decades, different prognostic factors have been investigated in order to predict which patients are going to progress in a short period of time. Among them, mutational status of the immunoglobulin heavy chain variable region (*IGHV*), and cytogenetic abnormalities detected by FISH have been consolidated as two of the most powerful factors. In addition, in some situations they indicate a different therapeutic approach. Mutations occur in approximately half of the cases, and usually present with non-progressive disease, in contrast to patients with a non-mutated pattern. FISH studies are able to detect clonal genomic aberrations in the majority (>80%) of CLL patients. The most common recurrent chromosomal abnormalities include: 13q deletion (13q-); 11q deletion (11q-); trisomy 12 (+12); and 17p deletion (17p-), defining five prognostic categories with different survival times. Besides, the percentage of cells with the deletion in the cases of 11q-, 13q- and 17p- also adds prognostic value.

## Aim, material, methods and results

The aim of this Thesis is to analyze the prognostic impact of particular and novel aspects about the mutational status *IGHV* and FISH in patients with CLL. The abstracts of the papers that compose this Thesis are shown next.

## Paper 1. Mutation Status and Immunoglobulin Gene Rearrangements in Patients from Northwest and Central Region of Spain with Chronic Lymphocytic Leukemia

In the first study, the mutational status and *IGHV* gene family usage was analyzed in 224 CLL patients from central and northwest region of Spain. The mutated pattern was detected in 55.8% of the cases and they had a better overall survival (OS) and time to first treatment (TTFT) than the non-mutated ones. An association with 13q-, and absence of CD38 was observed in patients with mutations; while non-mutated harbored more often 11q-, +12, 17p- and CD38. The most frequently used *IGHV* family was VH3 followed by VH1 and VH4. The regions VH3-30, VH1-69 and VH3-23 were the most commonly used. VH1-69 was expressed at a higher frequency in non-mutated patients, and these patients had a high probability to be treated and poor OS. VH3-11 was also associated with worse OS, and high-risk cytogenetic abnormalities. In the cases with VH5-51 a tendency to a worse OS and non-mutated pattern was observed. VH3-21 was detected in a low percentage of cases,

but most of them belonged to the group of mutated CLL, and among them, a tendency to a worse TTFT was observed.

### **Paper 2. A High Proportion of Cells Carrying Trisomy 12 is Associated with a Worse Outcome in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia.**

In this paper the cases with +12 were selected from the GCECGH (*Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica*) and GELLC (*Grupo Español de Leucemia Linfocítica Crónica*) databases. The best cutoff value that divided patients with +12 into prognostic subgroups, was 60% of cells with the trisomy. A total of 115 patients (39.8%) harbored trisomy 12 in  $\geq 60\%$  of the cells. These patients had worse TTFT and OS than cases with +12 in  $<60\%$ . In addition, in the multivariate analysis the TTFT maintained the statistical significance. The other variables with effect on TTFT were: B symptoms, clinical stage, lymphadenopathy, splenomegaly, lymphocytosis, 11q-,  $\beta 2$ -microglobulin (B2M), and LDH. The variables that demonstrated statistical significance in OS in the multivariate analysis were the clinical stage, B2M and 11q-.

### **Paper 3. Characterizing Patients with Multiple Chromosomal Aberrations Detected by FISH in Chronic Lymphocytic Leukemia.**

In this work, a total of 323 patients with multiple abnormalities (MA) detected by FISH were selected from the database of the GCEGCH and GELLC. The frequency of MA was 15.4%, and in most of the cases (63%) they were observed since diagnosis. The distribution of the combinations was heterogeneous, with the most frequent association being 13q- with 11q- (32.4%), followed by 13q- with 17p- (25.9%), 13q- with +12 (15.9%), complex-FISH (9.6%), +12 with 17p (8.3%), +12 with 11q- (4.1%), and 11q- with 17p- (3.8%). In patients with combinations involving 17p-, this deletion appeared as the minor clone suggesting it as a late genetic event, contrary to 13q- or +12. Survival analysis was restricted to cases with MA since the moment of diagnosis. Median TTFT in patients with MA was 27 months, and median OS was 76 months. Among cases with MA, the best TTFT was observed in the combination +12 and 13q-. MA containing 17p- showed a worse OS than MA without 17p-. Patients with complex-FISH were the ones with worse OS followed by patients with 17p- and another abnormality and patients with two alterations without 17p-.

#### **Paper 4. Hyperdiploidy as a Rare Event that Accompanies Poor Prognosis Markers in CLL**

In the last paper, the frequency and predictive impact of hyperdiploidy in CLL was determined. For this purpose, the database of the Salamanca University Hospital was scanned. Eight cases with hyperdiploidy (0.59%) were identified, and most of them presented it since diagnosis. The mutational status, available in 57% of cases, was in all of them non-mutated. Additional chromosomal abnormalities were detected in 57% of the patients, including: 17p- (2 cases), 11q- and *IGH* alteration (1 case) and deletion of 13q- and *IGH* (1 case). Only one patient showed a *TP53* mutation with a mutational burden of 95%, and without 17p-. Most of the patients (86%) required treatment with a median TTFT of 1.4 months. The median OS from the moment of diagnosis was 66 months, and from the time of acquisition of hyperdiploidy 20 months. TTFT and OS were significantly shorter compared to the group of patients without hyperdiploidy.

#### **Conclusions**

The results presented in this Thesis point out novel aspects about the mutational status of *IGHV* and FISH studies. Regarding the mutational status, patients with mutated pattern have better prognosis than the non-mutated ones, and VH1-69, VH3-11 and VH5-51 segments were associated with poor prognosis. In relation to FISH, our work reveals three factors that contribute to poor prognosis in CLL: *i*) to have a percentage of cells with +12  $\geq$  60%; *ii*) Multiple FISH abnormalities, carried since the time of diagnosis; *iii*) Hyperdiploidy, although it is a very unusual finding.



# AGRADECIMIENTOS



Después de un largo camino, llegó el momento de agradecer a todas las personas que me han ayudado en este recorrido. En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de Tesis, los Doctores Hernández Rivas y Álvarez-Sala. Gracias a José Ángel por acogerme en su servicio y brindarme la oportunidad de realizar este trabajo. Nunca me imaginé que a partir de aquel primer artículo acabaría escribiendo la Tesis. Muchas gracias por tus consejos, orientación y por ayudarme a sacar buen provecho del trabajo diario con ilusión. Pero sobre todo, por creer en mí y darme tantas oportunidades para crecer como hematóloga. Muchas gracias al Profesor Álvarez Sala por su disponibilidad, sus ánimos y su confianza.

También quiero expresar mi agradecimiento a las personas que colaboran con la base de datos del GECGH y GELLC, y en especial al grupo de Salamanca. Al Profesor Jesús María Hernández Rivas por sus ideas, aportaciones y por todo el tiempo dedicado a los artículos de esta Tesis. A las Doctoras María Hernández y Ana Rodríguez por su disponibilidad, cercanía y contribuciones. ¡Muchas gracias a los tres por vuestra gran ayuda!

Agradezco a la Asociación Madrileña de Hematología y Hemoterapia por su colaboración mediante la Beca de Ayuda de Impulso a la Investigación 2017.

No me puedo olvidar de todos los compañeros y docentes que me han acompañado en mi recorrido como médico, tanto en los años de universidad, como durante la residencia en el Hospital Universitario Gregorio Marañón y en mis primeros años de adjunta en el Hospital Universitario Infanta Leonor. En especial quiero agradecer a la Doctora Mónica Ballesteros por haber sido mi “maestra”, además de una gran amiga.

Muchas gracias a mi familia. A mis padres, Almudena y Quico, por haberme transmitido el valor del trabajo bien hecho, la constancia y el esfuerzo. Por su apoyo, ánimos e ilusión con todos mis proyectos vitales tanto personales como profesionales. Vuestra insistencia y motivación han sido muy importantes en el recorrido de la Tesis. A mi abuela Isabel, por su alegría constante y su ejemplo. A mis hermanos Almu y Pablo, con quienes comparto tantos buenos momentos. A mis suegros, Víctor y Carmen por su cariño y su ayuda, sobre todo los domingos de “spa”. El agradecimiento más especial es para mi marido, Marcos, que es quien más me ha “sufrido” a lo largo de la elaboración de la Tesis. Gracias por ser generoso con tu tiempo, al haberme ahorrado innumerables horas de trabajo. Gracias por animarme a sentarme noche tras noche, y por tu ejemplo previo en el mundo de la investigación. Pero sobre todo, gracias por tu cariño incondicional, por quererme como soy, y porque es un regalo compartir la vida contigo. Por último, gracias a Carmen y a Cristina, mis dos tesoros, a las que quiero con locura.



# ÍNDICE

<b>1 Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Características generales de la leucemia linfocítica crónica .....	3
1.1.1 Definición y diagnóstico .....	3
1.1.2 Etiología .....	5
1.1.3 Manifestaciones clínicas y complicaciones.....	5
1.1.4 Diagnóstico diferencial.....	8
1.1.5 Factores pronósticos .....	8
1.1.6 Escalas pronósticas.....	11
1.1.7 Tratamiento .....	12
1.2 Estado mutacional del gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina ( <i>IGHV</i> ) .....	16
Estado mutacional <i>IGHV</i> y pronóstico de la LLC.....	16
Familias de genes de la región variable de las inmunoglobulinas y su asociación con características de la LLC .....	18
1.3 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	19
1.3.1 Clasificación pronóstica de Döhner .....	20
1.3.2 Alteraciones poco frecuentes y alteraciones múltiples.....	24
1.4 Publicaciones que componen el presente trabajo de Tesis Doctoral .....	26
<b>2 Hipótesis</b> .....	<b>29</b>
2.1 Bases y fundamentos de la hipótesis.....	31
2.2 Hipótesis .....	31
<b>3 Objetivos</b> .....	<b>33</b>
<b>4 Artículo 1: Mutation status and Immunoglobulin Gene Rearrangements in Patients from Northwest and Central Region of Spain with Chronic Lymphocytic Leukemia</b> .....	<b>37</b>
<b>5 Artículo 2: A high proportion of cells carrying trisomy 12 is associated with a worse outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia</b> .....	<b>47</b>
<b>6 Artículo 3: Characterizing patients with multiple chromosomal aberrations detected by FISH in chronic lymphocytic leukemia</b> .....	<b>59</b>
<b>7 Artículo 4: Hyperdiploidy as a rare event that accompanies poor prognosis markers in CLL</b> .....	<b>71</b>

<b>8</b>	<b>Discusión general.....</b>	<b>81</b>
8.1	El estado mutacional de <i>IGHV</i> en una cohorte de pacientes de la región central y noroeste de España .....	85
8.1.1	Los enfermos con mutaciones somáticas en <i>IGHV</i> presentan buen pronóstico.....	85
8.1.2	La distribución de familias y segmentos VH es heterogénea según la zona geográfica y existe una relación entre determinados segmentos VH con el estado mutacional y el pronóstico .....	86
8.1.3	Las alteraciones citogenéticas de buen pronóstico se asocian con mutaciones en <i>IGHV</i> y las de mal pronóstico con perfil no mutado.....	87
8.2	Características de los pacientes con LLC y trisomía del cromosoma 12 .....	88
8.2.1	El porcentaje de células con +12 por FISH subdivide grupos con diferente curso clínico .....	89
8.2.2	Otras características que predicen la SG y el TPT en los pacientes con +12 .....	90
8.3	Características de los pacientes con alteraciones múltiples (AM) detectadas por FISH .....	91
8.3.1	La distribución entre las AM no es homogénea al ser las alteraciones más frecuentes 13q- con 11q- o 17p- y la menos frecuente 11q- con 17p- .....	92
8.3.2	Las +12 y 13q- son eventos iniciales, mientras que 17p- se adquiere de forma más tardía en la evolución de la LLC .....	92
8.3.3	Los pacientes con AM desde el diagnóstico presentan una SG y TPT similares a los pacientes de alto riesgo citogenético.....	93
8.4	Características de los pacientes con hiperdiploidía detectada por FISH .....	94
8.4.1	La hiperdiploidía en la LLC es un hallazgo muy infrecuente.....	94
8.4.2	La hiperdiploidía se asocia con factores de mal pronóstico para la LLC	94
<b>9</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>101</b>
<b>11</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>121</b>
	<b>Anexo A – Material suplementario del Capítulo 5 (Artículo 2).....</b>	<b>123</b>
	<b>Anexo B – Material suplementario del Capítulo 6 (Artículo 3).....</b>	<b>125</b>
	<b>Anexo C – Material suplementario del Capítulo 7 (Artículo 4).....</b>	<b>127</b>

# LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de clasificación para el diagnóstico de LLC (10). .....	5
Tabla 2. Diagnóstico diferencial mediante marcadores inmunofenotípicos de la LLC y otras neoplasias B crónicas con expresión periférica (adaptado de Matutes <i>et al.</i> (10,31)). .....	8
Tabla 3. Mutaciones genéticas recurrentes más frecuentemente observadas en los pacientes con LLC en el momento del diagnóstico. ....	10
Tabla 4. Escala pronóstica de Rai (19). .....	11
Tabla 5. Escala pronóstica de Binet (20). .....	11
Tabla 6. Escalas pronósticas más relevantes en la LLC. ....	13
Tabla 7. Criterios para iniciar tratamiento para la LLC según el consenso internacional “IWCLL 2008” (9). .....	14
Tabla 8. Frecuencia y características de las familias de genes IGHV más prevalentes y su distribución. ....	19



# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frotis de sangre periférica de un paciente con LLC (imagen extraída del Atlas del Grupo Español de Citología Hematológica).....	4
Figura 2. Supervivencia global de acuerdo a los subgrupos de pacientes del CLL-IPI (adaptado del <i>International CLL-IPI working group</i> (69)). .....	13
Figura 3. Algoritmo terapéutico actual en un paciente con LLC en primera línea (adaptado de Barrientos <i>et al.</i> (77)).....	17
Figura 4. Proceso de maduración del linfocito B que da origen a los dos tipos de LLC (adaptado de Kipps <i>et al.</i> (97)). .....	17
Figura 5. Supervivencia de los pacientes con LLC en función de su estado mutacional (adaptado de Hamblin <i>et al.</i> (98)).....	18
Figura 6. Probabilidad de supervivencia en función de la alteración citogenética detectada por FISH en casos con LLC (adaptado de Döhner <i>et al.</i> (126)).....	21
Figura 7. Probabilidad de recibir tratamiento en función de la alteración citogenética detectada por FISH en casos con LLC (adaptado de Döhner <i>et al.</i> (127)).....	21
Figura 8. Relación temporal entre las alteraciones citogenéticas y moleculares durante la evolución de la LLC (adaptado de Landau <i>et al.</i> (128)).....	22



# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



13q- Delección del brazo largo del cromosoma 13

11q- Delección del brazo largo del cromosoma 11

17p- Delección del brazo corto del cromosoma 17

+12 Trisomía 12

AHAI Anemia hemolítica autoinmune

AM Alteraciones múltiples

AMO Aspirado de médula ósea

*ATM* Ataxia teleangiectasia mutada

BCR Receptor de célula B

*BIRC3* Proteína 3 baculoviral IAP

BR Bendamustina rituximab

$\beta$ 2-microglobulina B2M

CC Cariotipo complejo

CIR Clorambucilo rituximab

CLL-IPI *Chronic Lymphocytic Leukemia- International Prognostic Index*

EMR Enfermedad mínima residual

ERIC *European Research Initiative on CLL*

FCR Fludarabina ciclofosfamida rituximab

FISH Hibridación *in situ* fluorescente

GCEGCH Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica

GELLC Grupo Español de LLC

*IGHV* Gen de la región variable del gen de la cadena pesada de inmunoglobulina

LBDCG Linfoma B difuso de célula grande.

LBM Linfocitosis B monoclonal

LLC Leucemia linfocítica crónica

*MYD88* Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88

MDACC MD *Anderson Cancer Center*

*NOTCH-1* Proteína homóloga neurogénica 1

OMS Organización Mundial de la Salud

PTI Trombocitopenia inmune primaria

RB1 Retinoblastoma 1

RC Respuesta completa

*SF3B1* Factor de *splicing* 3B subunidad 1

SG Supervivencia global

SLP Supervivencia libre de progresión

*TP53* Gen supresor de tumores p53

TPT Tiempo hasta el primer tratamiento

ZAP-70 Proteína asociada a la cadena zeta

# 1 INTRODUCCIÓN



## 1.1 Características generales de la leucemia linfocítica crónica

### 1.1.1 Definición y diagnóstico

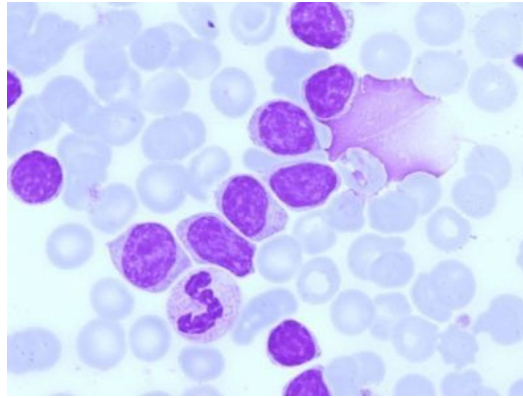
La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una neoplasia de célula B madura que se caracteriza por la proliferación y acumulación de linfocitos B en sangre periférica, médula ósea, bazo y ganglios linfáticos. Para establecer su diagnóstico se requiere la presencia de al menos  $5 \times 10^9/L$  linfocitos monoclonales con fenotipo de LLC en sangre periférica. En los casos en los que no existe linfocitosis, pero sí afectación extramedular por células de LLC, se prefiere el término de linfoma linfocítico de célula pequeña (1,2).

La LLC es el tipo de leucemia más frecuente en los países occidentales, con una incidencia aproximada en Europa de 5 casos por 100.000 habitantes/año (3). Afecta principalmente a personas de edad avanzada, con una mediana de edad al diagnóstico entre 67 y 72 años, aunque en los últimos años se tiende a diagnosticar en edades más tempranas debido al número creciente de analíticas rutinarias que se realizan a la población general. Es más prevalente en varones que en mujeres con una proporción 2:1 (4,5).

La linfocitosis B monoclonal (LBM) se define como la expansión de linfocitos B clonales con inmunofenotipo de LLC en sujetos sanos, sin otros datos de linfoma. Si se utilizan técnicas de citometría de flujo de alta sensibilidad, se puede detectar hasta en el 12% de individuos mayores de 40 años (6). Es un acontecimiento que precede al desarrollo de la LLC en todos los casos, si bien no todos los casos de LBM evolucionan a LLC. De hecho, una de las novedades de la reciente actualización de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la existencia de dos tipos de LBM: (a) número bajo de linfocitos, definido por la presencia de  $< 0,5 \times 10^9/L$  linfocitos B clonales; y (b) recuento alto, en el que se observan  $\geq 0,5 \times 10^9/L$ . Esta puntualización es importante, ya que la LBM de “número bajo de linfocitos” no necesita seguimiento médico rutinario, porque raramente evoluciona a LLC, a diferencia de la LBM de “alto recuento” en la que se deben hacer revisiones como si se tratase de una LLC en estadio inicial (7).

#### 1.1.1.1 Citología

En sangre periférica se observa típicamente un infiltrado linfocitario monomorfo de linfocitos maduros con cromatina condensada en acúmulos y un citoplasma escaso, discretamente basófilo sin granulación (**Figura 1**) (5). Las sombras de Gumprecht, o sombras nucleares, acompañan a los linfocitos, y se ha especulado que cuando son  $> 30\%$



**Figura 1.** Frotis de sangre periférica de un paciente con LLC (imagen extraída del Atlas del Grupo Español de Citología Hematológica).

condicionan un pronóstico mejor (8). No es infrecuente observar algunos prolinfocitos acompañando a las células de LLC, que deben suponer < 10%; o células con el núcleo hendido, también en baja proporción.

La médula ósea se caracteriza por ser hipercelular a expensas de una infiltración linfocitaria de al menos un 30%. En la biopsia existen varios patrones de infiltración: nodular, difuso e intersticial. El aspirado/biopsia de médula ósea no es una prueba indispensable para el diagnóstico de esta enfermedad. Debe realizarse en casos excepcionales como, por ejemplo, para diagnosticar el origen de las citopenias o detectar la enfermedad mínima residual (EMR) tras finalizar un tratamiento (9).

### 1.1.1.2 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica crucial para establecer el diagnóstico de LLC, pues confirma la naturaleza clonal de los linfocitos, e identifica un patrón de marcadores típicos de la enfermedad. La LLC se caracteriza por expresar los marcadores de célula B: CD19, CD20 y CD22. CD20 y CD22 se expresan de forma débil y CD79b suele ser negativo o expresarse muy débilmente. FMC7 es negativo. Además, se observa una restricción de las cadenas de superficie de inmunoglobulinas *lambda* o *kappa*, que se expresan también débilmente. El marcador de célula T CD5 es característico, y CD200 suele expresarse de forma fuerte y puede ayudar a establecer el diagnóstico diferencial con otros síndromes linfoproliferativos B con expresión hemoperiférica.

Si bien existe un sistema de clasificación, ampliamente utilizado en la práctica clínica para establecer el diagnóstico de LLC (**Tabla 1**), existen algunos casos atípicos con variaciones en la expresión de algunos marcadores previamente descritos (10–12).

**Tabla 1.** Sistema de clasificación para el diagnóstico de LLC (11).

Marcador	Puntos	
	1	0
CD5	Positivo	Negativo
CD23	Positivo	Negativo
FMC7	Negativo	Positivo
Cadenas ligeras de Ig	Débil	Moderado/Fuerte
CD22/CD79b	Débil/Negativo	Moderado/Fuerte

4-5 puntos= diagnóstico de LLC-; 3 puntos= diagnóstico poco probable de LLC-; < 3 puntos= no LLC

### 1.1.2 Etiología

La causa inicial que origina la LLC es desconocida, a diferencia de otros tumores (13). Sin embargo, parece existir una predisposición familiar a desarrollar la enfermedad. Mediante citometría de flujo se puede detectar una LBM hasta en un 17% de los familiares de pacientes con LLC (14). Además, en los casos familiares se observa con relativa frecuencia el fenómeno de anticipación genética (15). Actualmente se están utilizando técnicas de secuenciación masiva para el estudio de las causas genéticas que predisponen a padecer la enfermedad en los casos familiares. Como posibles agentes causales, se han encontrado algunos polimorfismos, o la desregulación de los telómeros (16,17).

En cuanto a la patogenia de la enfermedad, la teoría más aceptada es que la célula que origina la LLC se vuelve clonal tras la interacción de su receptor de célula B (BCR) con un “autoantígeno”, que promueve su expansión posterior (18).

### 1.1.3 Manifestaciones clínicas y complicaciones

#### 1.1.3.1 Síntomas y signos

La LLC se caracteriza por presentar un curso clínico altamente heterogéneo. En muchos de los casos su diagnóstico es un hallazgo en pacientes asintomáticos que se someten a una analítica rutinaria. Otros casos se diagnostican tras padecer síntomas derivados de la enfermedad. En primer lugar, la acumulación de linfocitos puede originar citopenias, y a consecuencia de ello el paciente puede presentar síndrome anémico, clínica hemorrágica o infecciones. Únicamente el 5-10% de los pacientes consultan por presentar los típicos síntomas “B” asociados a linfoma que se detallan a continuación:

- Pérdida no intencionada  $\geq 10\%$  del peso corporal en los últimos 6 meses.
- Fiebre de origen no infeccioso durante al menos 2 semanas.

- Sudoración nocturna profusa.

Las adenopatías son el hallazgo que se encuentra más habitualmente en la exploración física. Los lugares más frecuentemente afectados son las regiones cervical, supraclavicular y axilar. La esplenomegalia ocurre en alrededor del 25% de los casos y suele ser no dolorosa, mientras que la hepatomegalia solo ocurre en torno al 15% (19,20). La infiltración extraganglionar de órganos y tejidos por células de LLC es más rara, aunque posible. La piel es el lugar extraganglionar más frecuentemente afecto, aunque únicamente se produce en <5% de los casos.

### 1.1.3.2 Complicaciones

Durante la evolución de la enfermedad no es infrecuente observar diversas complicaciones no solo debidas a la LLC, sino también a consecuencia de los tratamientos que se administran.

#### 1.1.3.2.1 Infecciosas

Las infecciones son la principal causa de muerte en los pacientes con LLC y son responsables de aproximadamente el 50% de las mismas. Se deben no solo a una alteración cuantitativa del sistema inmune (neutropenia, hipogammaglobulinemia), sino a una alteración cualitativa del mismo, principalmente a la disfunción de los linfocitos T acompañantes (21,22). Además, los tratamientos específicos para la LLC contribuyen al deterioro del sistema inmune. Con el fin de prevenir las infecciones, se pueden utilizar las siguientes estrategias:

- Vacunación contra la gripe y el neumococo.
- Administración de inmunoglobulinas inespecíficas en pacientes con infecciones recurrentes y niveles de inmunoglobulina G <500 mg/dL (23,24).
- Uso de factor estimulante de colonias granulopoyéticas en las fases de neutropenia (25).
- Profilaxis antibióticas específicas según el tratamiento utilizado.

#### 1.1.3.2.2 Autoinmunes

La anemia hemolítica autoinmune (AHAI), caracterizada por presentar una prueba de la antiglobulina (test de Coombs) directa positiva y datos analíticos de hemólisis, puede ocurrir hasta en el 5-10% de los pacientes con LLC (26). Se ha relacionado además con el uso de análogos de las purinas, y es más frecuente en estadios avanzados de la enfermedad.

La aplasia pura de células rojas es una complicación infrecuente que se caracteriza por la ausencia de progenitores eritroides en la médula ósea. Se debe sospechar en anemias con recuento de reticulocitos bajo y su diagnóstico se confirma con un aspirado de médula ósea (AMO) y biopsia.

La trombocitopenia inmune primaria (PTI) sintomática se observa en aproximadamente el 3% de los pacientes con LLC. Suele cursar como un episodio de trombocitopenia aguda y, si se asocia con AHAI, se denomina síndrome de Evans (27).

En general estas complicaciones se tratan con inmunosupresores como los corticoides, anticuerpos monoclonales anti-CD20 o, en situaciones de respuesta subóptima, mediante el tratamiento específico de la LLC subyacente (28).

### 1.1.3.2.3 Transformación

El síndrome de Richter, o transformación de la LLC, consiste en la aparición de un linfoma de alto grado en un paciente con LLC. Esta complicación ocurre entre un 2-9% de los casos de LLC y es más frecuente en pacientes que presentan alteraciones en los genes *TP53*, *NOTCH-1* o *MYC* (29). En el 95% de los casos consiste en una evolución a linfoma B difuso de célula grande (LBDCG), y en el 5% restante a un linfoma de Hodgkin. Recientemente se ha documentado que existen dos tipos diferentes de síndromes de Richter (30):

- Clonalmente relacionado (90%): Pronóstico infausto, con una mediana de supervivencia de unos 3 meses.
- Clonalmente independiente (10%): Pronóstico similar al de un LBDCG *de novo*.

El otro tipo de transformación que puede surgir de la LLC, mucho más infrecuente, es a una leucemia prolinfocítica B, caracterizada por la aparición de >55% de prolinfocitos en sangre periférica. En estos casos, el cuadro clínico suele cursar con leucocitosis llamativa ( $>100 \times 10^9/L$ ), esplenomegalia y menor carga adenopática, y es más común en los pacientes que han recibido tratamientos previos con fludarabina.

### 1.1.3.2.4 Segundas neoplasias

Existe una probabilidad aumentada de desarrollar un tumor sólido en los pacientes con LLC respecto a la población general. Se desconoce si esto es debido al efecto de los tratamientos utilizados o a la desregulación del sistema inmune propia de la enfermedad

## 1. Introducción

**Tabla 2.** Diagnóstico diferencial mediante marcadores inmunofenotípicos de la LLC y otras neoplasias B crónicas con expresión periférica (adaptado de Matutes et al. (11,32)).

Neoplasia linfoide B	Cadenas ligeras	Marcador inmunofenotípico						Otros
		CD5	CD23	FMC7	CD22	CD79b	CD200	
LLC	Débil	++	++	-/+	Débil/neg	Débil/neg	++	
LLC atípica	Débil	++	++	-/+	Débil/neg	Débil/neg	++	
Leucemia prolinfocítica-B	Fuerte	-/+	-	++	+	++	Débil/neg	
Tricoleucemia	Fuerte	-	-	++	++	+	+/-	CD11c y CD103
Linfoma folicular	Fuerte	-/+	-/+	++	++	++	-	CD10 +/-
Linfoma de células del manto	Fuerte	++	-	++	++	++	Débil/neg	CD20 fuerte
Linfoma de la zona marginal	Fuerte	-/+	-/+	++	++	++	-	CD20 fuerte
Macroglobulinemia de Waldenström	Fuerte	-	-	+	+	+	-	CD20 fuerte

neg=negativo; LLC= leucemia linfocítica crónica

(31). También se ha observado incremento de los casos de leucemia aguda y síndrome mielodisplásico.

### 1.1.4 Diagnóstico diferencial

Fundamentalmente, la linfocitosis es el hallazgo ante el que se debe plantear el diagnóstico diferencial de la LLC. Ésta puede ser reactiva o clonal. Las causas reactivas de linfocitosis pueden ser originadas por linfocitos B (esplenectomía, tabaquismo, esplenomegalia en paludismo), o por linfocitos T (bacterianas, virales, enfermedad del suero, enfermedad de Addison, tirotoxicosis, esplenectomía). Las causas neoplásicas también pueden ser originadas por linfocitos B o T. El mayor dilema se plantea con los síndromes linfoproliferativos B de bajo grado. En la **Tabla 2** se describen las principales características inmunofenotípicas que permiten realizar el diagnóstico diferencial en estos casos.

### 1.1.5 Factores pronósticos

Los pacientes con LLC presentan un pronóstico extremadamente variable. Hay enfermos que necesitan recibir tratamiento desde el momento del diagnóstico, mientras otros permanecen asintomáticos o nunca serán tratados en el curso de su evolución. Por tanto, los marcadores pronósticos son importantes para predecir el curso clínico, además de aportar un mejor conocimiento de la biología de la enfermedad. En los últimos 20 años se ha producido una revolución en este campo, con la aparición y consolidación de multitud de factores pronósticos clínicos, analíticos, biológicos, genéticos y moleculares. En este apartado se describen brevemente los factores pronósticos más relevantes. El estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGHV*), y las alteraciones

citogenéticas detectadas por FISH se expondrán en un apartado específico, debido a su relevancia en esta Tesis.

### 1.1.5.1 Marcadores analíticos

Los marcadores séricos lactato deshidrogenasa (LDH) y,  $\beta$ 2-microglobulina (B2M) indican alta carga tumoral cuando se encuentran elevados. No son específicos de la LLC ya que se elevan también en otras neoplasias, linfomas u otras situaciones clínicas como la insuficiencia renal en el caso de la B2M, pero son sencillos de determinar en la práctica clínica habitual (33).

La duplicación linfocitaria en 6 meses o el aumento de la cifra de linfocitos superior al 50% respecto al control previo en 2 meses constituyen factores pronósticos fácilmente aplicables (34) que, además, forman parte de los criterios para iniciar tratamiento (35).

### 1.1.5.2 Expresión de proteínas

El nivel de expresión de las proteínas CD38, ZAP-70 (proteína asociada a la cadena zeta) y CD49d, detectadas mediante citometría de flujo, influyen en el pronóstico de los pacientes con LLC.

La expresión elevada de CD38 confiere un curso clínico agresivo. Sin embargo, es un marcador con algunas limitaciones, pues su expresión varía durante la evolución de la enfermedad, y no está claro el punto de corte de positividad que se debe considerar, ya que según los distintos estudios publicados, éste fluctúa entre el 7 y el 30% (36–38).

En cuanto a CD49d, su expresión superior al 30% se asocia con pronóstico clínico malo. Además, recientemente, se ha demostrado que es el factor pronóstico citométrico con mayor impacto clínico (39,40).

Por último, la expresión de ZAP-70, con punto de corte igual o superior al 20%, se ha asociado con mal pronóstico, además de ser un marcador auxiliar de la existencia de un patrón no mutado del gen *IGHV* (41,42).

### 1.1.5.3 Marcadores moleculares

Las técnicas de secuenciación masiva han ayudado a identificar nuevos marcadores pronósticos (43–46) entre los que destacan los genes: supresor de tumores p53 (*TP53*), ataxia teleangiectasia mutada (*ATM*), proteína homóloga neurogénica 1 (*NOTCH-1*), factor de *splicing* 3B subunidad 1 (*SF3B1*), proteína 3 baculoviral IAP (*BIRC3*) y respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (*MYD88*). En la **Tabla 3** se resumen las principales características que confieren estas mutaciones.

## 1. Introducción

**Tabla 3.** Mutaciones genéticas recurrentes más frecuentemente observadas en los pacientes con LLC en el momento del diagnóstico.

Mutación	Cromosoma	Asociación	Función biológica	Pronóstico	Frecuencia
<i>NOTCH1</i>	9	trisomía 12	señalización de NOTCH1	malo	10-15%
<i>SF3B1</i>	2	deleción 11q	<i>splicing</i> del ARN mensajero	malo	5-10%
<i>BIRC3</i>	11	deleción 11q	señalización NF-κB	malo	4%
<i>MYD88</i>	3	deleción 13q	señalización NF-κB	bueno	3%
<i>ATM</i>	11	deleción 11q	maquinaria de reparación ADN	malo	12%
<i>TP53</i>	17	deleción 17p	maquinaria de reparación ADN	muy malo	5-10%

LLC= leucemia linfocítica crónica

Las mutaciones de *TP53* se detectan en el 5-10% de las LLC en el momento del diagnóstico, aunque su incidencia aumenta en pacientes refractarios o con síndrome de Richter hasta el 40-50%. Su presencia es de importancia crítica, pues separa un subgrupo de pacientes con muy mal pronóstico, quimio-refractarios y que necesitan un abordaje terapéutico diferente (47–50).

En la misma línea, las mutaciones en *ATM*, se asocian con un pronóstico y supervivencia malos y un patrón *IGHV* no mutado (51,52).

Los pacientes que presentan mutaciones en *NOTCH-1* también presentan pronóstico adverso. Se han detectado hasta en el 30% de los enfermos que evolucionan a síndrome de Richter. Además, en pacientes con trisomía 12 (+12) diferencian casos con mal pronóstico (53,54).

Otro marcador molecular que confiere mal pronóstico es *SF3B1*, que suele ir acompañado de deleción 11q (11q-) o mutaciones en *ATM* (55).

Las mutaciones de *BIRC3* son las menos frecuentes y se han asociado con resistencia a la fludarabina en los casos en los que no se detectan alteraciones de *TP53* (56). En cambio, las mutaciones de *MYD88* se han asociado con buen pronóstico en los pacientes con LLC (57).

Por otra parte, las técnicas de secuenciación masiva han ayudado a conocer mejor la complejidad genética de la LLC. Además de la heterogeneidad genómica que ocurre entre pacientes con LLC, dentro de un mismo paciente existe también heterogeneidad intratumoral. Se sabe que la evolución del cáncer puede darse por la selección de subclones (alteraciones que existen en un pequeño porcentaje de las células tumorales). Estos subclones pueden adquirir una ventaja proliferativa tras ser seleccionados por un tratamiento o mediante el microambiente celular (58), y convertirse en mutaciones clonales (presentes en

**Tabla 4.** Escala pronóstica de Rai (19).

Estadio	Características			Riesgo	SPV (años)
	Territorios adenopáticos	Hb	Plaquetas		
A	Adenopatías ≤ 2 territorios	≥ 10 g /dL	≥ 100 x 10 <sup>9</sup> /L	Bajo	12
B	≥ 3 áreas linfáticas afectas	≥ 10 g /dL	≥ 100 x 10 <sup>9</sup> /L	Intermedio	7
C		< 10 g /dL	< 100 x 10 <sup>9</sup> /L	Alto	2-4

SPV=supervivencia

**Tabla 5.** Escala pronóstica de Binet (20).

Estadio	Características	Riesgo	SPV (años)
0	Linfocitosis en sangre periférica y médula ósea	Bajo	10
1	Linfocitosis + adenopatías	Intermedio	7
2	Linfocitosis +/- hepatomegalia o esplenomegalia	Intermedio	7
3	Linfocitosis + anemia (Hb < 11g/dL)	Alto	1,5 - 4
4	Linfocitosis + trombopenia (plaquetas < 100x10 <sup>9</sup> /L)	Alto	1,5 - 4

SPV=supervivencia

todas las células tumorales). Además, el clon dominante puede cambiar a lo largo de la evolución de la enfermedad y contribuir a distintos tipos de recaída (59). Casi todas las mutaciones y alteraciones cromosómicas en la LLC pueden ser clonales o subclonales en función del caso.

#### 1.1.5.4 Otros marcadores pronósticos

Existen muchos más factores que se han asociado con el pronóstico de los pacientes con LLC publicados en la literatura. A continuación se enumeran los más relevantes junto con los descritos previamente: edad, sexo, patrón de infiltración medular, porcentaje de sombras de Gumprecht, porcentaje de prolinfocitos, la expresión de algunos microRNAs (60,61), niveles elevados de lipoproteínlipasa y más recientemente, la enfermedad mínima residual negativa tras administrar un tratamiento (60–63).

### 1.1.6 Escalas pronósticas

#### 1.1.6.1 Sistemas clásicos de Rai y Binet

Los sistemas de clasificación de Rai y Binet (19,20) se publicaron hace más de 40 y 35 años, respectivamente, y siguen vigentes en la actualidad en la práctica clínica habitual, pues discriminan bien grupos pronósticos, son fácilmente aplicables y no implican ningún coste adicional (véase **Tabla 4** y **Tabla 5**). Su principal desventaja es la incapacidad para discriminar pacientes de alto riesgo dentro de los estadios iniciales.

### 1.1.6.2 Otras escalas pronósticas emergentes

En los últimos años se han publicado diferentes escalas pronósticas que han demostrado ser capaces de predecir el curso clínico de los pacientes con la agrupación de los factores descritos previamente (64–68). Éstas quedan resumidas en la **Tabla 6**.

Sin embargo, ninguna había terminado de consolidarse como definitiva por diferentes motivos. El índice pronóstico ideal, debe ser clínicamente relevante, fácilmente aplicable, orientado a tomar decisiones terapéuticas, y factible en la práctica clínica habitual. La reciente publicación del índice *Chronic Lymphocytic Leukemia- International Prognostic Index* (CLL-IPI) que combina los estadios de Rai/Binet con el estado mutacional, la edad, los niveles de B2M y las alteraciones de *TP53*, cumple casi todos los requisitos mencionados anteriormente y es capaz de dividir pacientes en 4 grupos pronósticos en función de su supervivencia global (SG), como se puede observar en la **Figura 2** (69). Además, algunas evidencias recientes sugieren que también es válida al aplicarla de forma simplificada, al tener únicamente en cuenta las alteraciones citogenéticas de mal pronóstico, determinadas por FISH y el estado mutacional (70).

Una de las limitaciones de todas estas escalas es que se han validado con pacientes tratados en la era de la quimioterapia o, como mucho, de la inmunquimioterapia, por lo que no pueden generalizarse a los enfermos que reciben tratamientos nuevos, como los inhibidores del receptor del linfocito B.

### 1.1.7 Tratamiento

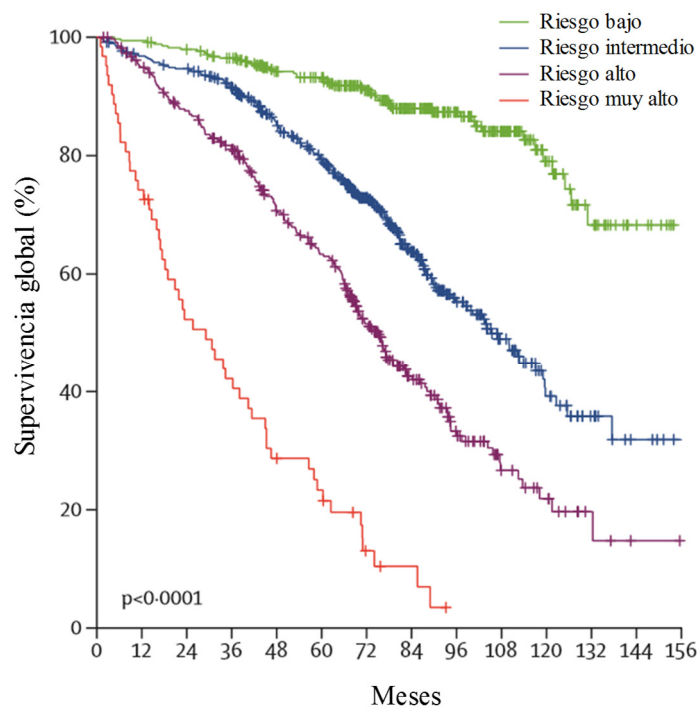
El arsenal terapéutico para la LLC está sufriendo una auténtica revolución en el momento actual a consecuencia de la incorporación de nuevos tratamientos que han proporcionado resultados clínicos excelentes. De hecho, es un tema en constante debate y evolución.

#### 1.1.7.1 Criterios para iniciar tratamiento

Pese a los grandes avances terapéuticos, la LLC sigue siendo una enfermedad incurable, con la excepción del trasplante alogénico. Este procedimiento debe reservarse para casos muy seleccionados debido a la alta mortalidad que produce. Además, muchos pacientes sin tratamiento presentan tasas de supervivencia similares a la población normal y, hasta la fecha, no se ha encontrado beneficio al tratar la enfermedad en fases tempranas. Incluso se han descrito remisiones espontáneas en casos aislados (71). Por tanto, se debe utilizar la actitud de “vigilar y ver” (*watch and wait*) hasta la aparición de síntomas provocados por la enfermedad. Los criterios actuales para iniciar tratamiento quedan recogidos en la **Tabla 7**.

**Tabla 6.** Escalas pronósticas más relevantes en la LLC.

Escala pronóstica	Factores pronósticos incluidos
Haferlach <i>et al.</i> , 2010	Edad Recuento leucocitario Estado mutacional <i>IGHV</i> Translocaciones IgH FISH Mutaciones en <i>TP53</i> y <i>ATM</i>
Wierda <i>et al.</i> , 2011	LDH Numero de áreas linfáticas afectas Tamaño de adenopatías cervicales Estado mutacional <i>IGHV</i> FISH
Rossi <i>et al.</i> , 2013	FISH <i>TP53, BIRC3, NOTCH1, SF3B1</i>
Pflug <i>et al.</i> , 2014	Sexo Edad ECOG FISH Estado mutacional <i>IGHV</i> $\beta$ 2-microglobulina Timidina kinasa
ICSS. Visentín <i>et al.</i> , 2015	CD38 FISH Mutaciones <i>IGHV</i>



**Figura 2.** Supervivencia global de acuerdo a los subgrupos de pacientes del CLL-IPI (adaptado del International CLL-IPI working group (69)).

**Tabla 7.** Criterios para iniciar tratamiento para la LLC según el consenso internacional “IWCLL 2008” (9).

Criterios para el inicio de tratamiento IWCLL 2008
1. Evidencia de fallo medular progresivo (anemia/trombopenia).
2. Esplenomegalia progresiva y sintomática (al menos 6 cm por debajo del reborde costal).
3. Afectación ganglionar progresiva, sintomática o masiva (al menos > 10 cm).
4. Linfocitosis progresiva: $\geq 50\%$ en 2 meses; duplicación linfocitaria en < 6 meses. En casos con linfocitosis $< 30 \times 10^9/L$ , este no debe ser el único criterio. Excluir causas infecciosas de
5. AHAI o trombopenia inmune que no responda a corticoides o tratamiento estándar.
6. Síntomas constitucionales: <ul style="list-style-type: none"><li>a. Pérdida no intencionada de peso de al menos 10% en 6 meses.</li><li>b. Astenia (ECOG <math>\geq 2</math> o incapacidad para realizar las actividades rutinarias).</li><li>c. Fiebre <math>\geq 38^\circ C</math> durante al menos 2 semanas sin evidencia infecciosa.</li><li>d. Sudoración nocturna de más de un mes de evolución sin evidencia infecciosa.</li></ul>

### 1.1.7.2 Panorama actual en el tratamiento de la LLC

#### 1.1.7.2.1 Inmunoquimioterapia

Los tratamientos clásicos para la LLC se han basado en corticoides y quimioterapia. Los agentes alquilantes, fundamentalmente el clorambucilo y la ciclofosfamida, seguidos por los análogos de las purinas, sobre todo la fludarabina, fueron el pilar de tratamiento durante muchos años. Más tarde, se aprobó la bendamustina, un fármaco olvidado que se rescató con muy buenos resultados, principalmente para pacientes mayores de 65 años o con comorbilidades (72–74). Pero sin duda, la llegada de la inmunoterapia, en concreto del anticuerpo monoclonal rituximab (anti CD20), ha sido el primer paso hacia el progreso en el tratamiento de la LLC (73–76). La combinación fludarabina, ciclofosfamida, rituximab (FCR) se utiliza como tratamiento de primera línea para pacientes jóvenes y sin comorbilidades y constituye, hoy en día, el estándar de tratamiento, en los pacientes con patrón mutado de *IGHV*. Por su parte, bendamustina más rituximab (BR) se utiliza en pacientes mayores de 65 años o con comorbilidades, y la combinación rituximab clorambucilo (CIR) en los pacientes más frágiles (77,78).

Después del rituximab, han surgido dos nuevos anticuerpos monoclonales anti CD20, que se han aprobado en combinación con quimioterapia para el tratamiento de la LLC. Ofatumumab, es un anticuerpo humanizado que se une a un epítipo diferente de CD20 que rituximab, y ha demostrado ser superior a clorambucilo en monoterapia al combinarse con clorambucilo (79). Obinutuzumab posee una mayor citotoxicidad que rituximab y, de hecho, ha demostrado ser superior en combinación con clorambucilo a rituximab y clorambucilo,

con una mayor supervivencia libre de progresión (SLP), tasa de respuestas globales y de respuestas completas (RC) (80,81).

### **1.1.7.2.2 Inhibidores del receptor de célula B (BCR)**

Sin ninguna duda, la auténtica revolución en el tratamiento de la LLC ha venido de la mano de los inhibidores de la vía de señalización del BCR.

Ibrutinib es un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton que se administra por vía oral y que ha demostrado inducir respuestas ganglionares muy rápidas en los pacientes con LLC en monoterapia (82). Este beneficio también se observa en pacientes con delección de 17p (17p-) o mutaciones de *TP53*, en los que la quimio-inmunoterapia no es eficaz (83).

Idelalisib es un inhibidor de la vía PI3K delta, oral, y de forma análoga a ibrutinib, ha demostrado ser muy eficaz en pacientes con LLC en combinación con rituximab, incluyendo casos con 17p- o mutaciones en *TP53* (84). Sin embargo, la toxicidad que ocasiona ha limitado su uso (85,86).

Actualmente, hay otros inhibidores del BCR de segunda generación en estudio, como acalabrutinib, con resultados prometedores (87).

### **1.1.7.2.3 Inhibidores de BCL-2**

Venetoclax es otro fármaco oral, inhibidor selectivo de BCL-2, que ha demostrado ser muy eficaz en pacientes con LLC en recaída o refractarios, incluyendo los casos con 17p- o mutaciones de *TP53*, o refractarios a inhibidores de BCR (88,89). Además, el programa de desarrollo clínico de venetoclax comprende su evaluación como fármaco de primera línea y diversas combinaciones, con un futuro prometedor dada su eficacia en los estudios iniciales (90).

### **1.1.7.2.4 Otros tratamientos**

Otros tratamientos que se han utilizado históricamente para los pacientes con 17p- o mutaciones de *TP53* son las dosis altas de metilprednisolona junto con rituximab, o el anticuerpo monoclonal anti CD52, alemtuzumab. Estas opciones producen respuestas modestas a costa de complicaciones infecciosas severas (51,52).

Existen muchos otros tratamientos, nuevas moléculas en desarrollo y combinaciones de fármacos en estudio, como los agentes inmunomoduladores (lenalidomida) (93), o la terapia con CAR (*Chimeric Antigenic Receptors*) *T-cells*. Los CARs han demostrado producir respuestas en aproximadamente un 50% de pacientes previamente refractarios y en franca progresión, aunque todavía son un tratamiento en fase de investigación (94). El trasplante

allogénico en el momento actual se reserva para pacientes jóvenes que no han respondido a inhibidores de BCR o BCL-2, y los que presentan una transformación a síndrome de Richter.

En la **Figura 3** se refleja un algoritmo terapéutico que recoge las opciones de tratamiento de primera línea en la LLC en el momento actual (24,77,78).

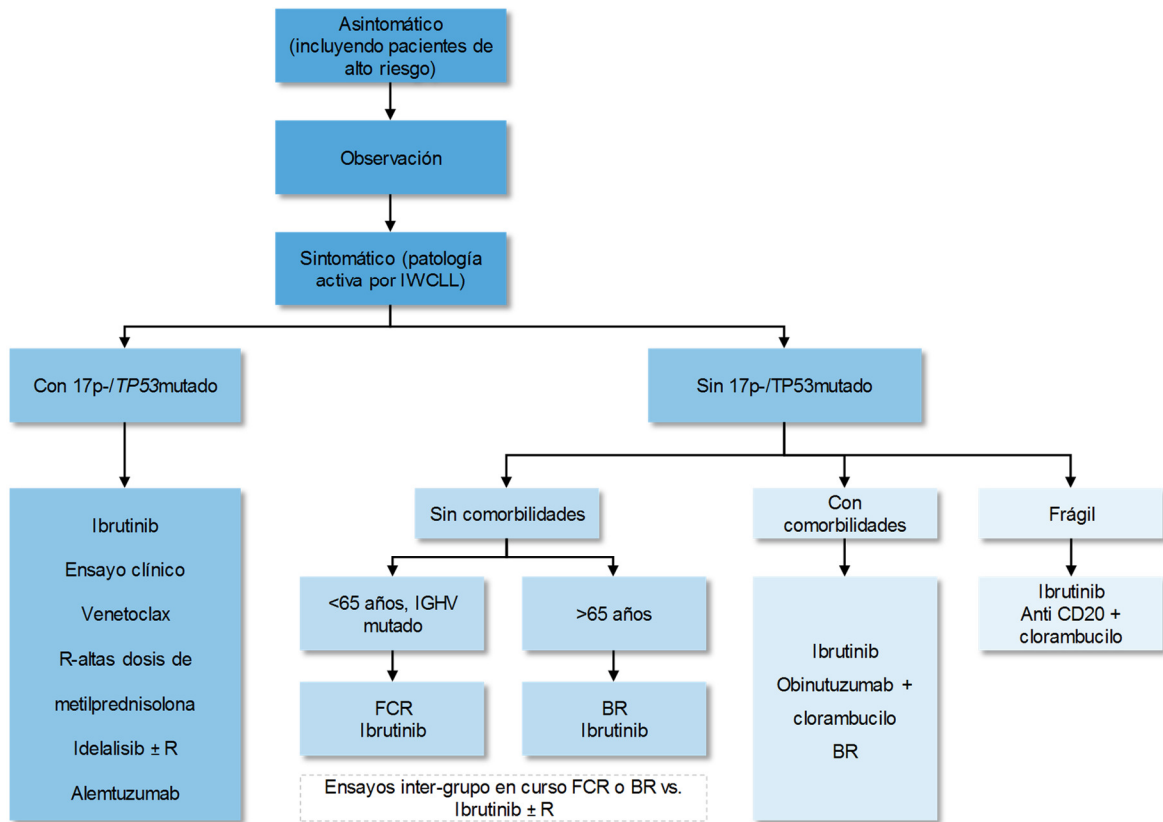
## 1.2 Estado mutacional del gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IGHV*)

### 1.2.1 Estado mutacional *IGHV* y pronóstico de la LLC

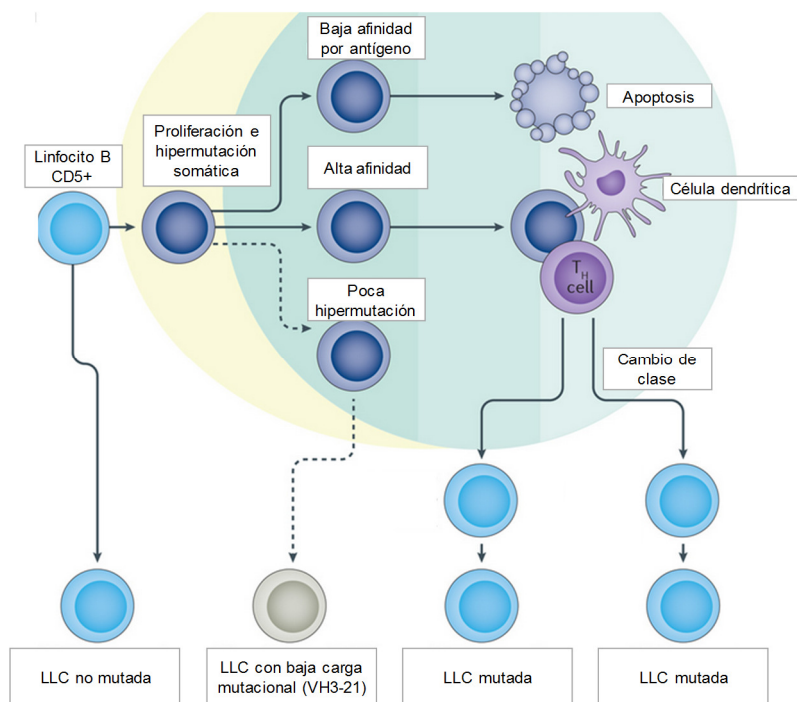
El proceso de hipermutación somática ocurre en el centro germinal de los órganos linfoides secundarios, cuando un linfocito B maduro entra en contacto con un antígeno. Consiste en la generación de una tasa elevada de mutaciones en el gen *IGHV* con el fin de mejorar la afinidad del linfocito por el antígeno, lo que permite la síntesis de un amplio espectro de receptores de célula B (BCR) (95). Las mutaciones en el gen *IGHV* ocurren en aproximadamente el 50% de los casos de LLC y se definen por presentar una discrepancia mayor del 98% con respecto al gen más similar de la línea germinal. Por tanto, se podrían definir dos tipos de LLC: las “mutadas” que son aquellas que se originan a partir de células que han pasado por el centro germinal; y las “no mutadas” con origen en linfocitos B pre-centro germinal (**Figura 4**).

Identificar si el paciente presenta o no mutaciones en *IGHV* es de elevada trascendencia, puesto que tiene un importante valor pronóstico. Este dato se comunicó por primera vez hace casi 20 años, por 2 grupos independientes de forma simultánea (96,97). Estos grupos encontraron que las LLC no mutadas presentan un pronóstico peor que las mutadas, con una SLP, tiempo hasta el primer tratamiento (TPT) y SG menores (**Figura 5**). Además, se asocian con mayor frecuencia con factores pronósticos desfavorables como la presencia de la delección 11q (11q-), 17p- o positividad para ZAP-70 o CD38. Desde entonces, diferentes publicaciones han confirmado estos hallazgos a lo largo de los años, lo que ha posicionado al estado mutacional como uno de los factores con mayor valor en la estimación del pronóstico de los pacientes con LLC (42,64,98–100). Además es un factor que no cambia durante la evolución de la enfermedad.

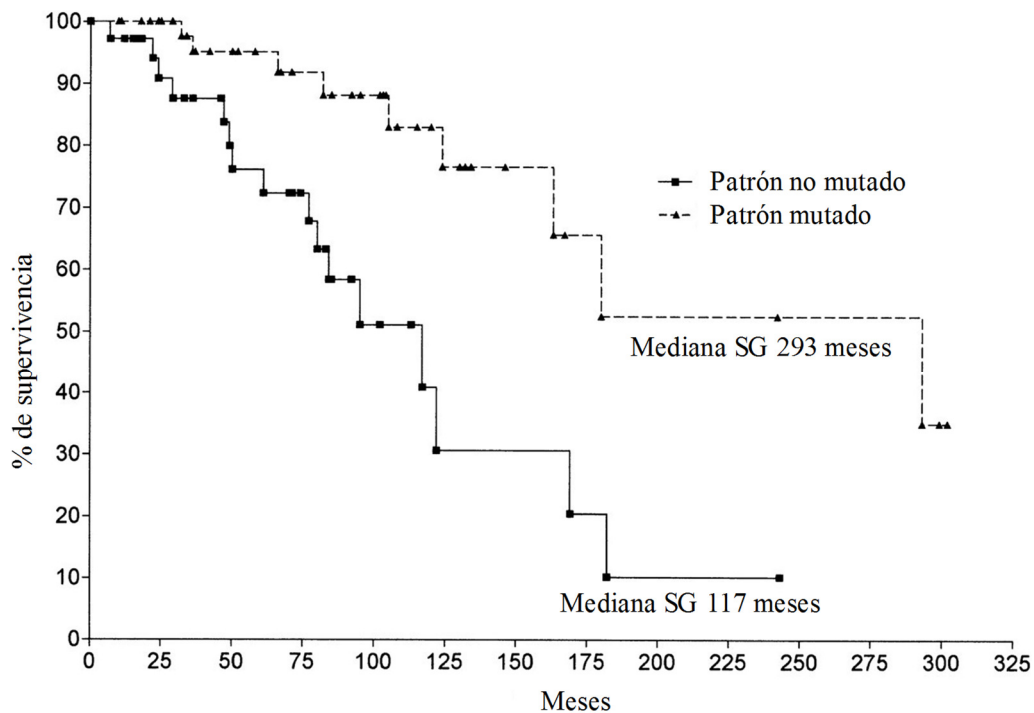
## 1.2. Estado mutacional del gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (IGHV)



**Figura 3.** Algoritmo terapéutico actual en un paciente con LLC en primera línea (adaptado de Barrientos et al. (77)).



**Figura 4.** Proceso de maduración del linfocito B que da origen a los dos tipos de LLC (adaptado de Kipps et al. (101)).



**Figura 5.** Supervivencia de los pacientes con LLC en función de su estado mutacional (adaptado de Hamblin et al. (98)).

Sin embargo, y pese a su gran valor pronóstico, aún no se dispone de esta técnica en todos los laboratorios de forma rutinaria. De hecho, en las recomendaciones del grupo internacional de LLC a día de hoy no es una prueba a realizar de forma obligatoria (9). Esto se debe principalmente a las dificultades metodológicas que existen en los laboratorios a la hora de implantar esta técnica, y a que las decisiones terapéuticas hasta hace muy poco no se hacían en función de los resultados obtenidos. Probablemente esto va a cambiar en los próximos años debido a los esfuerzos de estandarización de la técnica a nivel europeo (102–104), y a que en los pacientes jóvenes tener un perfil mutado puede hacer posicionarse hacia un tratamiento de primera línea con inmunoterapia frente a otros tratamientos dirigidos (105).

### 1.2.2 Familias de genes de la región variable de las inmunoglobulinas y su asociación con características de la LLC

Independientemente del estado mutacional, algunas regiones específicas del gen de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas se han asociado con características clínicas concretas y una distribución geográfica diferente. Por ejemplo, el gen *IGHV1-69* tiene una mayor prevalencia en países occidentales y se asocia más frecuentemente al patrón no mutado (106,107). Otras familias frecuentes en países

**Tabla 8.** Frecuencia y características de las familias de genes *IGHV* más prevalentes y su distribución.

Familia VH	Genes <i>IGHV</i>	Distribución geográfica	Perfil de mutaciones <i>IGHV</i>	Pronóstico
Familia VH 1	V1-69	El más frecuente en países mediterráneos y Estados Unidos. Más frecuente en occidentales que en orientales.	No mutado	Malo
	V3-23	De los más frecuentes en países mediterráneos/Sudamérica.	Mutado	Malo
	V3-7	El más frecuente en Irán. Similar en el resto de países con frecuencia en torno al 5%.	Mutado	Bueno
Familia VH 3	V3-30	De los más frecuentes en países mediterráneos.	Mutado	Casos con regresión espontánea de la LLC
	V3-21	Más frecuente en países del norte de Europa. Muy poca incidencia en países mediterráneos.	Mutado la mayoría	Malo aunque se trate de casos mutados
	V3-72	En general poco frecuente.	Mutado	Bueno
Familia VH 4	V4-34	De los más frecuentes en países mediterráneos. El más frecuente en países orientales.	Mutado	Bueno

occidentales son *IGHV3-23*, *IGHV4-34*, e *IGHV3-07*. En la **Tabla 8** se describen la frecuencia y principales características de los genes *IGHV* más prevalentes en los distintos países (107–115).

La familia *IGHV3-21* se ha observado con mayor frecuencia en países del norte de Europa que en las regiones mediterráneas, y se ha asociado con mal pronóstico independientemente del estado mutacional (108,112,113). Curiosamente este gen se asocia con el patrón *IGHV* mutado. Se especula que la discrepancia entre el uso preferencial de *IGHV3-21* en los casos mutados y el mal pronóstico asociado, sea por la exposición de las células tumorales a un antígeno común que perpetúe la estimulación linfocitaria (112,115). A raíz de estas observaciones, posteriormente se ha comunicado la existencia de diferentes tipos de LLC en función del subtipo de BCR de inmunoglobulinas que presenten. Éstos pueden ser heterogéneos (en un 70% de los casos) o casi idénticos o estereotipados (en el 30% restante). Dentro del subtipo estereotipado, se han descrito diferentes grupos de pacientes, siendo los más frecuentes el subtipo #1, #2, #4 y #8. Además, presentan diferentes características clínicas y biológicas y, así, los subtipos #1, #2 y #8 se asocian con mal pronóstico al contrario que el estereotipo #4 (116,117).

### 1.3 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH), del inglés *fluorescent in situ hybridization* es una técnica citogenética que utiliza sondas que emiten fluorescencia al hibridarse con regiones cromosómicas concretas, y así puede detectar alteraciones cromosómicas concretas

como deleciones, inserciones, duplicaciones e inversiones, entre otras. En el campo de la LLC supone una importancia especial puesto que puede encontrar alteraciones en aproximadamente el 70-80% de los casos, frente a la citogenética convencional, que solo lo hace en el 40-50%, debido al bajo índice mitótico de los linfocitos B patológicos *in vitro*. Con todo, la principal limitación de la FISH es su imposibilidad para ver alteraciones en las regiones cromosómicas no exploradas. Este hecho es especialmente importante en la detección de cariotipos complejos, que se han asociado con pronóstico infausto en la LLC (118–122). Recientemente, se han comunicado diferentes experiencias mediante técnicas de estimulación con mitógenos para superar esta limitación, con resultados alentadores (123–125). A día de hoy la citogenética convencional con mitógenos, no se utiliza ampliamente en la práctica clínica, aunque probablemente sea así en un futuro, haciéndose de forma complementaria a la FISH.

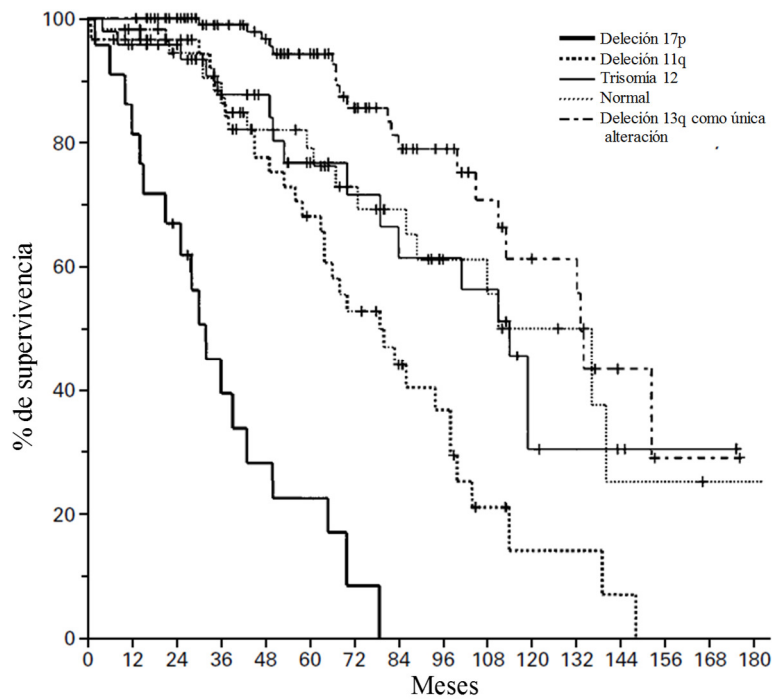
### 1.3.1 Clasificación pronóstica de Döhner

La publicación de Döhner *et al.* en el año 2.000 puso de manifiesto el gran impacto clínico que supone presentar alteraciones citogenéticas detectadas por FISH en la LLC (126). En este estudio, los pacientes con LLC presentaban alteraciones en el 82% de los casos. Éstas, por orden de frecuencia, fueron: deleción de 13q (13q-), 11q-, +12 y 17p-. Como se ve reflejado en la **Figura 6** y en la **Figura 7**, los pacientes con 17p- fueron los que tenían pronóstico peor con una mediana de supervivencia estimada de 32 meses y un TPT de 9 meses; seguidos de los pacientes con 11q- (SG 79 meses y TPT 13 meses); +12 (SG 114 meses y TPT 33 meses); no alteraciones (SG 111 meses y TPT 49 meses) y 13q- (SG 133 meses y TPT 92 meses).

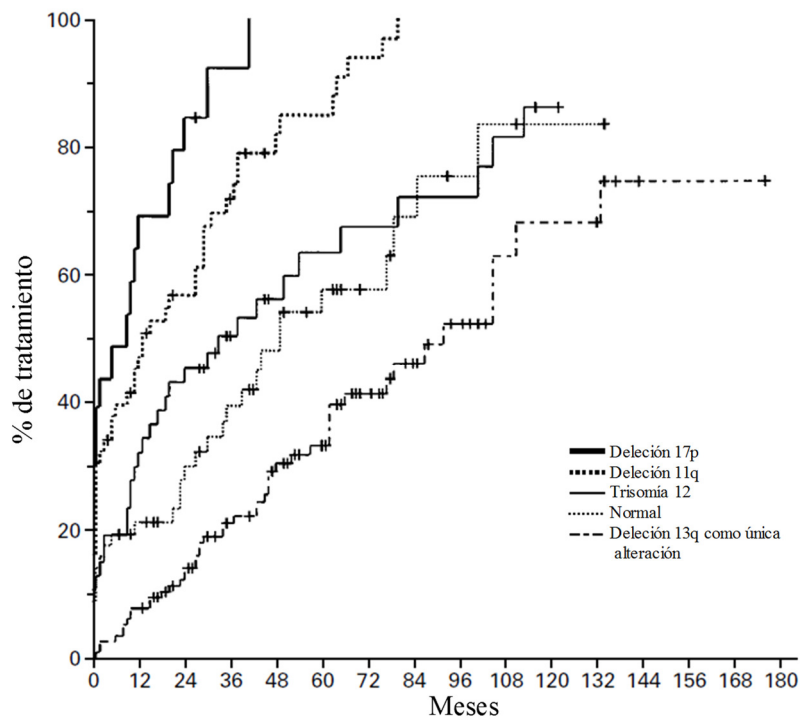
Estos hallazgos se han confirmado posteriormente por múltiples grupos (127,128), entre otros en un estudio muy reciente con 1.585 pacientes (129). En este estudio se reproducen los resultados del grupo alemán, aunque con tiempos de supervivencia más prolongados, probablemente por el efecto de los nuevos tratamientos, al ser una cohorte más reciente.

#### 1.3.1.1 Deleción 13q

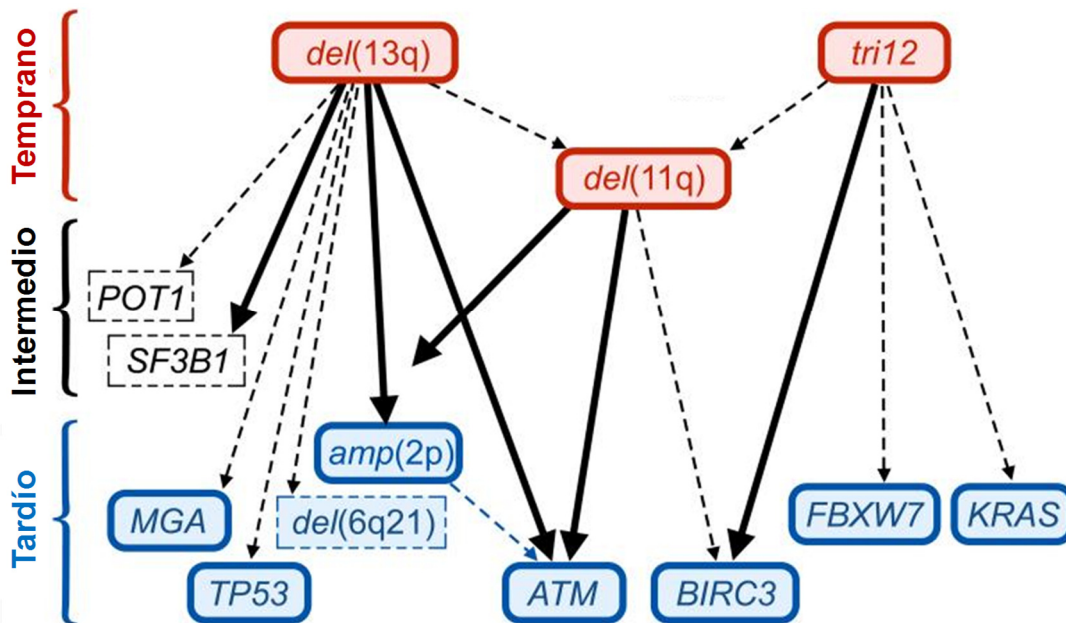
La 13q- es la alteración cromosómica más frecuente en la LLC, ya que se detecta por FISH en aproximadamente el 55% de los casos. Como se ha mencionado previamente, es la alteración que condiciona mejor pronóstico cuando aparece de forma aislada (65,126). La 13q- se considera una alteración clonal inicial, que ocurre en fases tempranas de la enfermedad, y sobre la que se pueden añadir otras durante la evolución de la misma (**Figura 8**) (130,131).



**Figura 6.** Probabilidad de supervivencia en función de la alteración citogenética detectada por FISH en casos con LLC (adaptado de Döhner et al. (126)).



**Figura 7.** Probabilidad de recibir tratamiento en función de la alteración citogenética detectada por FISH en casos con LLC (adaptado de Döhner et al. (126)).



**Figura 8.** Relación temporal entre las alteraciones citogenéticas y moleculares durante la evolución de la LLC (adaptado de Landau et al. (131)).

Sin embargo, existe heterogeneidad en los tipos de deleciones que afectan al cromosoma 13 y, por tanto, subgrupos de pacientes con diferente curso clínico. En primer lugar, según el tamaño de la deleción se pueden clasificar 2 tipos de casos: la 13q- tipo I o deleciones cortas, que son aquellas que no albergan el locus del gen del retinoblastoma 1 (RB1); y las 13q tipo II o deleciones grandes, que incluyen RB1. Estas últimas se han asociado con un curso clínico peor que las deleciones tipo I (132,133). Por otra parte, la 13q- es monoalélica en la mayoría de los casos, y esto no parece asociarse con el pronóstico de la enfermedad, aunque ha sido un tema de controversia (129,134–137). Por último, el tamaño del clon que presenta la deleción ha demostrado tener implicación pronóstica, con TPT y SG menores en los pacientes con un porcentaje elevado de células con 13q- cuyo punto de corte está entre el 65-85% en los diferentes estudios publicados (129,138–141).

### 1.3.1.2 Deleción 11q

La 11q- se detecta por FISH con una prevalencia inferior al 20% y aporta mal pronóstico (126). Normalmente, estos pacientes presentan síntomas B, grandes conglomerados adenopáticos, enfermedad progresiva, un TPT corto y una SG reducida. En esta misma línea, 11q- se asocia con patrón no mutado *IGHV* (142,143). Algunas publicaciones apuntan que el añadir inmunoterapia a los tratamientos “clásicos” con quimioterapia puede superar, en los pacientes que no han recibido otros tratamientos previamente, el mal pronóstico que acarrea 11q- (75,144). De forma parecida a lo que ocurre

con 13q-, no todos los pacientes que presentan esta deleción presentan el mismo curso clínico. De hecho, diferentes trabajos han confirmado que el porcentaje de células con la deleción también afecta al pronóstico de los pacientes, de tal modo que aquellos enfermos con un porcentaje alto de pérdidas en 11q presentan un curso clínico peor (145–147). La causa principal por las que 11q- confiere mal pronóstico a la enfermedad es la pérdida de *ATM*, que ocurre en la mayoría de los casos con 11q- (148). Por otra parte, el gen *BIRC3* también se encuentra en la región 11q cerca de *ATM* y sus mutaciones y deleciones se han asociado con un pronóstico infausto, como se ha descrito anteriormente (56).

#### 1.3.1.3 Trisomía 12

La +12 es la tercera alteración más frecuente en la LLC, al objetivarse en torno a un 15-20% de los casos (126). Si bien el pronóstico de estos pacientes se ha considerado intermedio tras la publicación inicial de la universidad de Ulm (126), hoy se sabe que se trata de un grupo de pacientes muy heterogéneo cuyo pronóstico ha sido tema de controversia. Una publicación reciente posiciona la +12 sin otras mutaciones como un grupo de riesgo bajo (65). Al igual que la 13q-, la +12 es un evento temprano que ocurre en fases iniciales de la LLC (**Figura 8**) (131). Los pacientes con +12 suelen presentar inmunofenotipo y morfología atípicas (149,150) y algunos marcadores de mal pronóstico como pueden ser el CD49d, CD38 o patrón no mutado de *IGHV* (151–153). En parte, la heterogeneidad clínica de estos casos se puede explicar por las alteraciones genéticas y moleculares sobreañadidas. En el 30-40% de los casos con +12, ésta ocurre en combinación con otras alteraciones, como pueden ser las deleciones “clásicas” de la LLC, la translocación de *IGH* o típicamente las trisomías 18 y 19 (120,154,155). Evidencias recientes señalan que la adición de otras trisomías a la +12, sobre todo la +19, separan un subgrupo de pacientes con mejor pronóstico (120). En cambio, las mutaciones de *NOTCH-1* se han observado en un 30-40% de los pacientes con +12, y confieren mal pronóstico (156–158). Los pacientes con +12 generalmente no presentan mutaciones en *TP53* y raramente las adquieren en la evolución, lo que probablemente pueda explicar el buen pronóstico de estos pacientes tras recibir tratamiento y que, hoy en día, se considere globalmente una alteración de pronóstico más benigno cuando se observa sin mutación en *NOTCH-1* (65,75).

#### 1.3.1.4 Deleción 17p

La 17p- es la alteración menos frecuente de las citadas previamente (126). Sin embargo, si se tienen en cuenta únicamente los casos refractarios a tratamientos o en recaída, su incidencia aumenta hasta el 45% (159). De hecho, esta alteración se considera un evento

tardío en la evolución de la enfermedad (**Figura 8**) (131,160). Además, la 17p- se asocia invariablemente con un pronóstico infausto debido a la pérdida del gen *TP53* al producirse la deleción (161). Se ha demostrado que en el 70% de los casos con 17p- existe también una mutación del gen *TP53* del otro alelo, en el 10% solo la 17p- y en el 20% restante, solo la mutación de *TP53* (162). Este gen se encarga de inducir apoptosis y parada del ciclo celular si encuentra ADN en mal estado, por tanto, su pérdida favorece que los pacientes desarrollen tumores con más facilidad y se acompañen de alteraciones genéticas complejas (163). No es de extrañar, en este contexto, la asociación de 17p- con factores de mal pronóstico como CD38, CD49d, patrón *IGHV* no mutado, o cariotipos complejos (42,164). Los pacientes con esta deleción no suelen responder a quimioterapia convencional, pues estos tratamientos utilizan mecanismos dependientes de *TP53*. Las recaídas son frecuentes y la SG está acortada, lo que hace que hoy en día los pacientes que presentan esta alteración requieran un abordaje terapéutico diferente con inhibidores de BCR (24,82,83,88,105,163,165). De hecho, se recomienda analizar esta alteración junto con la mutación *TP53* antes de iniciar cualquier línea de tratamiento. Parece que no todos los pacientes con 17p- tienen el mismo comportamiento, pues como en las demás deleciones, se ha demostrado que el porcentaje de células mutadas separa subgrupos de pacientes, de tal manera que en los que tienen una carga mutacional elevada el pronóstico es peor (166). Por último, el momento en el que se adquiere la alteración también es importante puesto que, si es en fases más iniciales, el pronóstico es algo mejor que si se adquiere durante la evolución (130).

### 1.3.2 Alteraciones poco frecuentes y alteraciones múltiples

La proporción baja de pacientes con alteraciones menos frecuentes o combinaciones de alteraciones detectadas por FISH en el estudio publicado por Döhner *et al.* (126) no hizo posible extraer conclusiones claras acerca de su pronóstico en la LLC. Sin embargo, a lo largo de los años se ha recabado información al respecto, aunque a veces ésta ha sido insuficiente o contradictoria.

#### 1.3.2.1 Translocación de 14q32/IGH

Esta alteración está descrita entre el 4-9% de los pacientes con LLC según las series. En el estudio del grupo alemán se incluyó junto con otras alteraciones por su frecuencia, sin poder llegar a confirmar el pronóstico de estos casos. Publicaciones posteriores han identificado a estos enfermos como de riesgo alto, con SG y TPT cortos (167–169). El compañero de translocación de IGH puede ser *BCL2*, t(14;18), cualquier otra región

cromosómica, o no identificarse. Parece ser que cuando se produce la t(14;18), el pronóstico es mejor que en el resto de casos (168).

### 1.3.2.2 Delección 6q

Esta alteración se ha descrito en menos del 6-7 % de los pacientes con LLC. Normalmente se encuentra en combinación con otras anomalías cromosómicas y parece que no aporta valor pronóstico (170,171).

### 1.3.2.3 Alteraciones múltiples

Según diferentes trabajos se estima que las deleciones clásicas y la +12 se combinan entre ellas en torno a un 15-20% de los casos (122,126,137,172). En el estudio de Döhner, salvo en la categoría de 13q- que separaba los casos con ésta alteración, las alteraciones múltiples (AM) se entremezclaban en los grupos. Posteriormente, diferentes publicaciones han descrito algunos aspectos de este subgrupo de pacientes. Entre ellos destaca que las combinaciones de alteraciones no se producen al azar. Así, las combinaciones más frecuentes son las de 13q- con 11q- o 17p- (137). La combinación de 13q- con +12 es un evento raro, y parece que el pronóstico de estos casos es peor que cuando se da la 13q- sola (168,173). Las pérdidas en 11q- y 17p- también constituyen una pareja de muy baja frecuencia y cuando están asociadas parece que constituyen un subgrupo de muy alto riesgo (174).

En cuanto al cariotipo complejo (CC), cada vez parece más evidente que su presencia condiciona un pronóstico muy adverso en los individuos con LLC. Éste se observa en torno a un 10% de los pacientes, o en proporciones más elevadas en el contexto de refractariedad y recaída. De hecho, como se ha mencionado previamente, la incorporación progresiva de los estudios de citogenética y estimulación con mitógenos es creciente en la práctica clínica, pues aportan una información complementaria muy importante en estos pacientes. El CC se define por la presencia de al menos 3 alteraciones en el cariotipo por técnicas de citogenética convencional (118,122,175). Presentar CC se asocia con factores de pronóstico adverso (17p-, 11q-, CD38, patrón *IGHV* no mutado). Por todo ello, hoy en día se considera uno de los factores más desfavorables en la LLC, incluso en la ausencia de 17p- o 11q-, o en pacientes tratados con inhibidores del BCR (118,119,121,123,124,175–178).

## 1.4 Publicaciones que componen el presente trabajo de Tesis Doctoral

Las dos técnicas más ampliamente utilizadas, consolidadas y con mayor valor pronóstico en la LLC a día de hoy son las alteraciones citogenéticas determinadas mediante FISH y el estado mutacional *IGHV*. La presente Tesis Doctoral pretende aportar nueva información acerca de factores pronósticos derivados de la realización de ambas técnicas. Este trabajo se ha concretado en los siguientes cuatro artículos publicados en revistas internacionales indexadas:

### 1. **Mutation Status and Immunoglobulin Gene Rearrangements in Patients from Northwest and Central Region of Spain with Chronic Lymphocytic Leukemia.**

González-Gascón Y Marín I, Hernández JA, Martín A, Alcoceba M, Sarasquete ME, Rodríguez-Vicente A, Heras C, de Las Heras N, Fisac R, García de Coca A, de la Fuente I, Hernández-Sánchez M, Recio I, Galende J, Martín-Núñez G, Alonso JM, Hernández-Rivas JM, González M.

*Biomed Res Int.* 2014;2014:257517. doi: 10.1155/2014/257517.

### 2. **A High Proportion of Cells Carrying Trisomy 12 is Associated with a Worse Outcome in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia.**

González-Gascón Y Marín I, Hernández-Sánchez M, Rodríguez-Vicente AE, Sanzo C, Aventín A, Puiggros A, Collado R, Heras C, Muñoz C, Delgado J, Ortega M, González MT, Marugán I, de la Fuente I, Recio I, Bosch F, Espinet B, González M, Hernández-Rivas JM, Hernández JÁ; Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC); Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH).

*Hematol Oncol.* 2016 Jun;34(2):84-92. doi: 10.1002/hon.2196.

### 3. **Characterizing Patients with Multiple Chromosomal Aberrations Detected by FISH in Chronic Lymphocytic Leukemia.**

González-Gascón Y Marín I, Hernández-Sánchez M, Rodríguez-Vicente AE, Puiggros A, Collado R, Luño E, González T, Ruiz-Xivillé N, Ortega M, Gimeno E, Muñoz C, Infante MS, Delgado J, Vargas MT, González M, Bosch F, Espinet B, Hernández-Rivas JM, Hernández JÁ; Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC) and Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH).

*Leuk Lymphoma.* 2017 Jul 21:1-10. doi: 10.1080/10428194.2017.1349901.

**4. Hyperdiploidy as a Rare Event that Accompanies Poor Prognosis Markers in CLL.**

González-Gascón Y Marín I, Martín AÁ, Hernández-Sanchez M, Robledo C, Hermosín ML, de Las Heras N, Lacalle L, Galende J, de Arriba F, Rodríguez-Vicente AE, Hernández JÁ, Hernández-Rivas JM.

*Eur J Haematol.* 2017 Feb;98(2):142-148. doi: 10.1111/ejh.12812.



# 2 HIPÓTESIS



## 2.1 Bases y fundamentos de la hipótesis

El pronóstico de los pacientes con LLC es muy variable, lo que se explica, en gran medida, por las alteraciones genéticas y moleculares que adquieren las células. Entre estas destacan el estado mutacional del gen *IGHV* y la clasificación según el resultado de las alteraciones citogenéticas determinadas mediante FISH, por su gran valor pronóstico y aplicabilidad en la clínica rutinaria. Sin embargo, hay pacientes con alteraciones concretas y heterogeneidad clínica y, por tanto, quedan aún matices por definir.

El estado mutacional de *IGHV* es uno de los factores pronósticos más importantes en la LLC. Los pacientes con perfil mutado del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas son los que presentan pronóstico mejor. Además, algunas familias de la cadena variable se han asociado con características clínicas específicas, y una distribución geográfica desigual.

Por otra parte, la FISH se ha consolidado como otro factor con una gran importancia pronóstica y se aplica ampliamente en la práctica clínica habitual en pacientes con LLC, ya que es capaz de identificar las deleciones de los cromosomas 11, 13, 17 y la trisomía del 12 en alrededor del 80% de los casos, lo que separa grupos de pacientes con distinto curso clínico. Diversas publicaciones han demostrado que el porcentaje de pérdidas constituye también un factor pronóstico importante, aunque en los casos con +12, la relevancia del porcentaje de la ganancia cromosómica no se ha investigado.

Además, el impacto pronóstico cuando más de una de estas alteraciones genéticas concurren en el mismo paciente tampoco se ha estudiado en series extensas de pacientes, aunque se sabe que aparece en un porcentaje de pacientes no desdeñable.

Por último, la presencia de varias ganancias cromosómicas en pacientes con LLC no parece ser un evento muy frecuente ya que solo se han comunicado casos anecdóticos y se desconoce su impacto pronóstico en estos enfermos.

## 2.2 Hipótesis

Todas estas premisas se han considerado para su análisis en una muestra amplia de pacientes con LLC, con el objetivo de responder las preguntas planteadas.

La primera hipótesis del presente trabajo de Tesis Doctoral fue confirmar en los pacientes de nuestra serie la importancia pronóstica del estado mutacional de *IGHV*, así como identificar qué familias VH están más presentes en nuestro entorno y con qué características clínico-biológicas.

## 2. Hipótesis

---

En segundo lugar, se investigó si el porcentaje de células que presentan +12 puede separar grupos de pacientes con diferente pronóstico respecto al TPT y la SG, de forma parecida a lo que ocurre con 11q-, 13q- y 17p-.

Además, es posible que los pacientes que presentan más de una alteración citogenética detectada por FISH, se comporten de manera distinta a los pacientes que presentan una única alteración.

Por último, se planteó que las ganancias cromosómicas son un evento muy raro en la LLC, en contra de lo que ocurre con otras enfermedades hematológicas, además de poder tener un impacto en el pronóstico de estos pacientes.

# 3 OBJETIVOS



---

El objetivo principal de este trabajo consiste en analizar el impacto pronóstico de determinadas alteraciones genéticas en los pacientes con LLC y estudiar las características clínico-biológicas de pacientes con esta enfermedad en una cohorte de enfermos españoles procedentes tanto de la base de datos del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCEGCH) y del Grupo Español de Leucemia Linfocítica Crónica (GELLC), como de la base de datos de pacientes con LLC del Hospital Universitario de Salamanca.

Los objetivos concretos propuestos para explorar la hipótesis planteada previamente se detallan a continuación:

1. Investigar el estado mutacional y la frecuencia de mutaciones en una cohorte de pacientes del noroeste y la parte central de España, así como estudiar la relación entre el estado mutacional y otros marcadores pronósticos.
2. Analizar las características clínico-biológicas de pacientes con LLC y +12, y el impacto pronóstico que conlleva tener un alto porcentaje de células con +12 en la SG y el TPT.
3. Estimar la frecuencia, características y pronóstico de los casos que presentan múltiples alteraciones citogenéticas detectadas por FISH.
4. Estudiar la incidencia de otras alteraciones menos frecuentes como el hallazgo de hiperdiploidía en LLC, de la que se desconocen sus características clínicas y biológicas, así como la influencia que pueden llegar a tener en el curso de la enfermedad.



# 4 ARTÍCULO 1: Mutation status and Immunoglobulin Gene Rearrangements in Patients from Northwest and Central Region of Spain with Chronic Lymphocytic Leukemia

I. González-Gascón y Marín, J. A. Hernández, A. Martín, M. Alcoceba, M. E. Sarasquete, A. Rodríguez-Vicente, C. Heras, N. de las Heras, R. Fisac, A. García de Coca, I. de la Fuente, M. Hernández-Sánchez, I. Recio, J. Galende, G. Martín-Núñez, J. M. Alonso, J. M.





Research Article

# Mutation Status and Immunoglobulin Gene Rearrangements in Patients from Northwest and Central Region of Spain with Chronic Lymphocytic Leukemia

I. González-Gascón y Marín,<sup>1</sup> J. A. Hernández,<sup>1,2</sup> A. Martín,<sup>3</sup> M. Alcoceba,<sup>3</sup> M. E. Sarasquete,<sup>3</sup> A. Rodríguez-Vicente,<sup>4</sup> C. Heras,<sup>1</sup> N. de las Heras,<sup>5</sup> R. Fisac,<sup>6</sup> A. García de Coca,<sup>7</sup> I. de la Fuente,<sup>8</sup> M. Hernández-Sánchez,<sup>4</sup> I. Recio,<sup>9</sup> J. Galende,<sup>10</sup> G. Martín-Núñez,<sup>11</sup> J. M. Alonso,<sup>12</sup> J. M. Hernández-Rivas,<sup>3,4</sup> and M. González<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Hematología, Departamento de Medicina, Hospital Universitario Infanta Leonor, Calle Gran Vía del Este 80, 28031 Madrid, Spain

<sup>2</sup> Universidad Complutense de Madrid, Avenida Séneca 2, 28040 Madrid, Spain

<sup>3</sup> Servicio de Hematología, IBSAL-Hospital Universitario de Salamanca, Paseo de San Vicente 58-182, 37007 Salamanca, Spain

<sup>4</sup> Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC, Universidad de Salamanca (USAL-CSIC), Calle Zacarías González 2, 37007 Salamanca, Spain

<sup>5</sup> Servicio de Hematología, Hospital Virgen Blanca, Calle Altos de Nava, s/n, 24071 León, Spain

<sup>6</sup> Servicio de Hematología, Hospital General de Segovia, Calle Miguel Servet, s/n, 4002 Segovia, Spain

<sup>7</sup> Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Avenida Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain

<sup>8</sup> Servicio de Hematología, Hospital del Río Hortega, Calle Dulzaina 2, 47012 Valladolid, Spain

<sup>9</sup> Servicio de Hematología, Hospital Nuestra Señora de Sonsoles, Plaza de Santiago 1, 05002 Ávila, Spain

<sup>10</sup> Servicio de Hematología, Hospital El Bierzo, Calle Médicos sin Fronteras 7, 24411 Ponferrada, León, Spain

<sup>11</sup> Servicio de Hematología, Hospital Virgen del Puerto, Paraje Valcorchero, 10600 Plasencia, Cáceres, Spain

<sup>12</sup> Servicio de Hematología, Hospital Río Carrión, Avenida Donantes de Sangre, s/n, 34005 Palencia, Spain

Correspondence should be addressed to J. A. Hernández; jahernandezr@salud.madrid.org

Received 18 December 2013; Revised 7 February 2014; Accepted 24 February 2014; Published 30 March 2014

Academic Editor: Paola Dal Cin

Copyright © 2014 I. González-Gascón y Marín et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The aim of this study was to investigate the frequency and mutation status of the immunoglobulin heavy variable chain (IGHV) in a cohort of 224 patients from northwest and central region of Spain diagnosed with chronic lymphocytic leukemia (CLL), and to correlate it with cytogenetic abnormalities, overall survival (OS) and time to first treatment (TTFT). 125 patients had mutated IGHV, while 99 had unmutated IGHV. The most frequently used IGHV family was IGHV3, followed by IGHV1 and IGHV4. The regions IGHV3-30, IGHV1-69, IGHV3-23, and IGHV4-34 were the most commonly used. Only 3.1% of the patients belonged to the subfamily IGHV3-21 and we failed to demonstrate a worse clinical outcome in this subgroup. The IGHV4 family appeared more frequently with mutated pattern, similar to IGHV3-23 and IGHV3-74. By contrast, IGHV1-69 was expressed at a higher frequency in unmutated CLL patients. All the cases from IGHV3-11 and almost all from IGHV5-51 subfamily belonged to the group of unmutated CLL.

## 1. Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a clinically and biologically heterogeneous disease, with survival times ranging

from months to decades [1, 2]. Rai and Binet staging systems were designed to provide prognostic information, and are widely used in clinical practice [3, 4]. However, some patients with early stages rapidly progress.

Over the past decade, several biological markers have become important prognostic factors and may guide treatment decisions. These include immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV) mutation status, expression of specific proteins on CLL cells such as CD38 and intracellular zeta-associated protein-70 (ZAP-70), and some cytogenetic abnormalities [5–9].

Clonal genomic aberrations can be identified in approximately 80% of CLL patients by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Usually, patients with deletion of chromosome 13q14 as a single alteration have a better outcome, although a high number of losses in 13q14 or large deletions including *RBI* gene could be associated with a worse outcome [10]. By contrast, patients with deletion of chromosome 11q22 or chromosome 17p13 show a shorter OS, while cases with trisomy 12 have an intermediate prognosis [7, 11].

The IGHV gene mutation status is one of the most reliable prognostic markers. It defines two different subsets of CLL based on the cutoff value of 98% identity with the closest germ line IGHV genes: mutated CLL (M-CLL) and unmutated CLL (U-CLL). Somatic mutations of IGHV occur in approximately half of the cases and usually present with non-progressive disease, in contrast to patients with U-CLL who have a more aggressive disease with a shorter progression-free survival, time to first treatment (TTFT), and overall survival (OS) [11, 12]. Furthermore, irrespective of mutation status, some heavy chain variable regions have been associated with specific clinical features and varying occurrences from country to country. For example, IGHV1-69 gene has been observed to be one of the most frequently rearranged genes in Western patients and is almost always associated with the subset of U-CLL [13]. Other subgroups reported to be frequently used in Western patients are IGHV3-23, IGHV4-34, and IGHV3-07. Moreover, an overrepresentation of the IGHV3-21 gene has been reported in northern European countries compared to the Mediterranean region, and it has been associated with a worse prognosis despite the mutation status [13, 14].

In this study, we investigated the frequency and mutation status of IGHV in a cohort of patients from northwest and central region of Spain. We also analyzed the relationship between IGHV mutation status and some other CLL prognostic markers such as the expression of CD38, cytogenetic abnormalities detected by FISH, OS, and TTFT.

## 2. Patients, Materials, and Methods

**2.1. Patients.** A total of 224 unselected patients diagnosed with typical CLL from nine different institutions located in northwest and central region of Spain were studied for IGHV gene usage and mutation status. The diagnosis was based on clinical symptoms, immunophenotypic analysis, blood cell count, and cell morphology, according to the World Health Organization classification of tumors [15] and National Cancer Institute guidelines [16]. The study was approved by the local ethics committee and all individuals provided their informed consent. The median age of the patients was 63 years (range, 29–90 years). A hundred

and fifty-two patients were male (68%) and seventy-two (32%) were female (male/female ratio = 2.1). At the time of diagnosis, most cases were classified as stage A (77%) according to Binet classification [4].

**2.2. Sample Processing and DNA Extraction.** Mononuclear cells were isolated using Ficoll density gradient centrifugation from peripheral blood samples containing more than 10% of CLL cells determined by flow cytometry. Genomic DNA was extracted and purified, washed, and lysed according to the manufacturer's instructions using the DNAzol kit (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA).

**2.3. PCR Amplification of IgH Rearrangements.** IGHV gene rearrangements were amplified by reverse transcription-PCR according to ERIC recommendations [17], using a mixture of 5' primers specific for framework region (FR) 1 consensus family (IGHV1-IGHV6), together with 3' primers complementary to the germ line JH regions. All samples were tested for the amplification of IGH rearrangements according to the BIOMED-2 Concerted Action protocols in whose standardization our group has participated actively [18]. In this strategy, complete V-D-J rearrangement amplification was performed by multiplex PCR with a set of family-specific primers of the framework region (FR1) and one IGHJ consensus primer. When amplification was unsuccessful, a second PCR was performed with primers from the IGHV leader region. In all cases amplification consisted of an initial denaturation step of 10 minutes at 95°C followed by 35 cycles of 94°C, 60°C, and 72°C for 30 seconds each, with a final extension step of 30 minutes at 72°C.

**2.4. Sequencing of PCR Products.** Clonality was assessed by size discrimination of PCR products using automatic ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in conjunction with GeneMapper 4.0 software (Applied Biosystems). To purify amplified products, they were run on 8% polyacrylamide gel, heteroduplexed in cases with polyclonal background, and visualized by ethidium bromide staining. Purified PCR products were then eluted from polyacrylamide gel and sequencing was performed from both directions, at least from 2 PCR reactions, using the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems) on an automated DNA Sequencer analyzer (ABI 3130, Applied Biosystems).

**2.5. Analysis of IG Gene Sequences.** The obtained sequences were aligned to V-Base (<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/list2.php>) data base. IGHV sequences with <98% homology with respect to the germ line counterpart were considered as mutated, while those with an identity greater than or equal to 98% were considered as unmutated. The cutoff value of 96% was also contemplated in order to analyze differences with possible prognostic interest.

**2.6. FISH Analysis.** Interphase FISH was performed on peripheral blood samples obtained at diagnosis using commercially available probes for the following regions: 13q14; 12q13; 11q22/ATM; 17pTP53; and 14q32/IGH (Vysis/Abbott

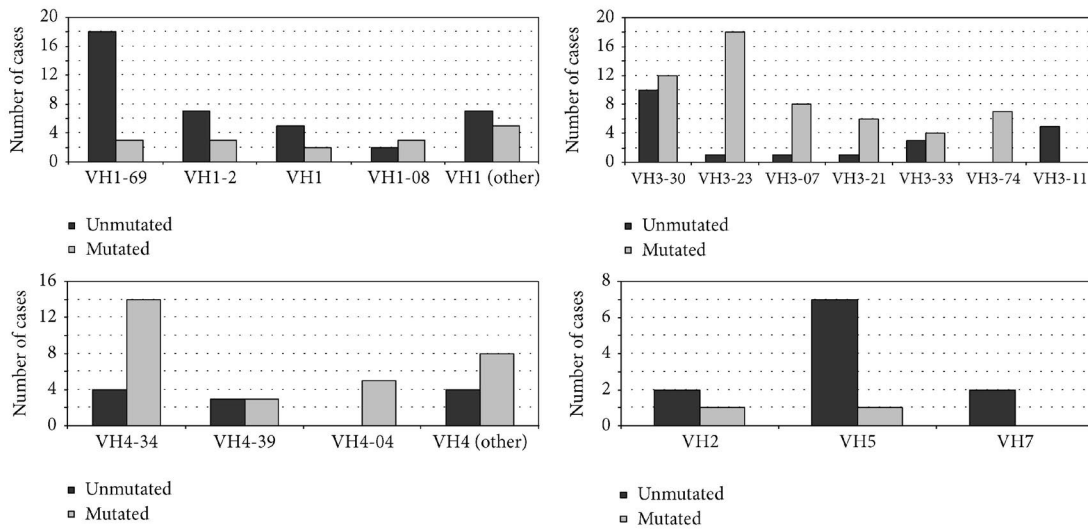


FIGURE 1: IGHV gene segments usage profile of patients with M-CLL and patients with U-CLL (number of cases).

Co., Downers Grove, IL, USA). Methods for FISH analysis are described elsewhere [19]. The sensitivity limit for the detection of 14q32 translocation, trisomy 12, and deletions was >3%, >3%, and >8% interphase cells with split signal, three signals, and one signal, respectively. Dual color FISH using differently labeled control probes was performed, and signal screening was carried out on at least 200 cells with well-delineated signals. Hybridization was repeated in those slides with less than 80% cells showing tow control-probe signals.

**2.7. CD38 Expression.** CD38 expression was analyzed by 4-colour fluorescence—activated cell sorting (FACS) analysis. For data analysis, the Infinicyt software (Cytognos SL, Salamanca, Spain) was used [20].

**2.8. Statistical Analysis.** Statistical analysis was performed using the SPSS 17.0 software package (SPSS, Chicago, IL, USA). The Fischer’s exact test and the Chi-squared test were used to determine the relationship between categorical variables. Quantitative variables were compared by using the Student’s *t*-test and the Mann-Whitney *U* test. OS was calculated from the time of diagnosis to death or last follow-up visit. TTFT was calculated as the interval between diagnosis and the start of first line treatment. OS and TTFT were estimated by the Kaplan-Meier method and assessed by the log-rank test. Statistical significance was defined as  $P < 0.05$ .

**3. Results**

**3.1. IGHV Mutation Status.** We analyzed mutation status of 224 patients with CLL. Based on a cutoff value of 98% nucleotide sequence homology of isolated IGHV gene with that of the germ line counterpart, a total of 125 (55.8%) cases were classified as M-CLL and 99 (44.2%) patients as U-CLL. When we considered 96% as the cutoff value, 102 (45.6%)

cases displayed somatic mutations, whereas 124 (54.4%) were unmutated.

**3.2. IGHV Gene Family Usage and Mutation Status.** IGHV gene usage was identified in 216 patients. The most frequently used IGHV family was IGHV3: 107 (49.5%), followed by IGHV1: 55 (25.5%), IGHV4: 41 (19.0%), IGHV5: 8 (3.7%), IGHV2: 3 (1.4%), and IGHV7: 2 (0.9%), with no expression of IGHV6. Mutation status ( $\geq 98\%$  homology) and its relationship with sex and IGHV rearrangements are summarized in Table 1.

IGHV3 and IGHV4 regions were found predominantly in the M-CLL cases (72/107,  $P = 0.004$ , and 30/41,  $P = 0.022$ , resp.) in contrast to IGHV1 genes, which were found predominantly in the U-CLL cases (37/55,  $P = 0.0001$ ). Only 3.2% of patients used IGHV5 regions, and 7 out of 8 cases displayed unmutated status ( $P = 0.023$ ).

Among IGHV1 family, IGHV1-69 was also preferentially expressed in U-CLL (18 versus 3 cases  $P < 0.0001$ ).

Regarding IGHV3 family, IGHV3-30 was the most common region used (20.6%), followed by IGHV3-23 (19%), with a low representation of IGHV3-7 (4.0%) and IGHV3-21 (3.2%). IGHV3-21 and IGHV3-7 expressed a mutated status in all but one case. Both IGHV3-23 ( $P < 0.0001$ ) and IGHV3-74 ( $P = 0.018$ ) presented more frequently the mutated pattern. By contrast, the five patients with IGHV3-11 belonged to the subgroup of U-CLL ( $P = 0.016$ ). Interestingly, within IGHV5 family, IGHV5-51 genes appeared to be mostly unmutated ( $P = 0.016$ ). Figure 1 shows IGHV gene segment usage profile of patients with M-CLL and patients with U-CLL.

**3.3. Association of Mutation Status and Rearranged IGHV Genes with Disease Outcome.** Patients with U-CLL seemed to have a more aggressive disease. Despite establishing homology in 98 or 96%, U-CLL patients presented with a higher

#### 4. Artículo 1: Mutation status and Immunoglobulin Gene Rearrangements in Patients from Northwest and Central Region of Spain with Chronic Lymphocytic Leukemia

TABLE I: Mutation status ( $\geq 98\%$  homology) and its relationship with IGHV rearrangements and sex.

IGHV family	Mutated cases	Unmutated cases	Mutated and unmutated	%	P	Male/female
IGHV1	2	5	7	3.2	ns	4/3
IGHV1-02	3	7	10	4.6	ns	5/5
IGHV1-03	2	2	4	1.9	ns	0/4
IGHV1-08	3	2	5	2.3	ns	3/2
IGHV1-18	2	2	4	1.9	ns	4/0
IGHV1-46	3	1	4	1.9	ns	3/1
IGHV1-69	3	18	21	9.7	<0.0001	15/6
Total IGHV1	<b>18</b>	<b>37</b>	<b>55</b>	<b>25.5</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>34/21</b>
IGHV2-01	1	0	1	0.5	ns	0/1
IGHV2-05	0	1	1	0.5	ns	0/1
IGHV2-70	0	1	1	0.5	ns	1/0
Total IGHV2	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1.4</b>	<b>ns</b>	<b>1/2</b>
IGHV3	3	2	5	2.3	ns	3/2
IGHV3-07	8	1	9	4.0	ns	9/0
IGHV3-09	2	2	4	1.9	ns	2/2
IGHV3-11	0	5	5	2.3	0.016	4/1
IGHV3-13	1	2	3	1.4	ns	3/0
IGHV3-15	4	2	6	2.8	ns	2/4
IGHV3-20	1	1	2	0.9	ns	1/1
IGHV3-21	6	1	7	3.2	ns	5/2
IGHV3-23	18	1	19	8.8	<0.0001	12/7
IGHV3-30	12	10	22	10.0	ns	17/5
IGHV3-33	4	3	7	3.2	ns	5/2
IGHV3-48	1	2	3	1.4	ns	3/0
IGHV3-49	2	2	4	1.9	ns	1/3
IGHV3-53	1	0	1	0.5	ns	1/0
IGHV3-64	0	1	1	0.5	ns	1/0
IGHV3-72	2	0	2	0.9	ns	2/0
IGHV3-74	7	0	7	3.2	0.018	5/2
Total IGHV3	<b>72</b>	<b>35</b>	<b>107</b>	<b>49.5</b>	<b>0.004</b>	<b>85/22, P = 0.088</b>
IGHV4-b	2	2	4	1.9	ns	1/3
IGHV4-04	5	0	5	2.3	0.051	3/2
IGHV4-30	1	1	2	0.9	ns	1/1
IGHV4-31	0	1	1	0.5	ns	1/0
IGHV4-34	14	4	18	8.3	ns	11/7
IGHV4-39	3	3	6	2.8	ns	3/3
IGHV4-59	2	0	2	0.9	ns	1/1
IGHV4-61	3	0	3	1.4	ns	2/1
Total IGHV4	<b>30</b>	<b>11</b>	<b>41</b>	<b>19</b>	<b>0.022</b>	<b>23/18</b>
IGHV5-05	0	1	1	0.5	ns	1/0
IGHV5-51	1	6	7	3.2	0.046	7/0
Total IGHV5	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>3.7</b>	<b>0.023</b>	<b>8/0, P = 0.05</b>
IGHV7-04	0	2	2	0.9	ns	0/2
Total IGHV7	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0.9</b>	<b>ns</b>	<b>0/2</b>

initial white blood cell count (WBC) (median  $31.5 \times 10^9/L$  versus  $21.2 \times 10^9/L$ ;  $P = 0.038$ ) and higher levels of LDH ( $P = 0.003$ ), belonged to advanced Binet stages ( $P = 0.001$ ), progressed more frequently ( $P < 0.0001$ ), and had a shorter leukocyte duplication time ( $P = 0.001$ ). Diffuse pattern of

bone marrow infiltration and secondary tumors ( $P = 0.047$ ) were also more often observed in this subgroup of patients.

The estimated median OS of the group with 98% or greater IGHV homology was 215 months, while the estimated median OS time of the subgroup with IGHV homology

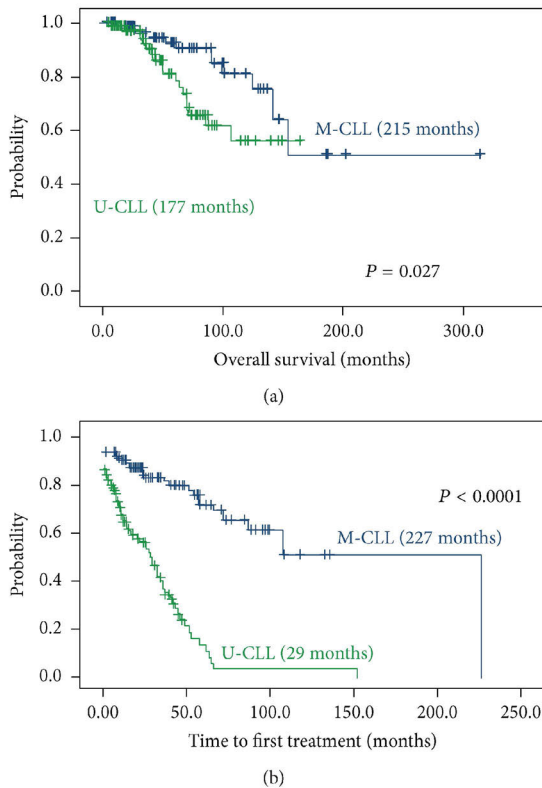


FIGURE 2: Kaplan-Meier survival curve comparing OS and TTFT between patients with M-CLL (125 cases) and U-CLL (99 cases). (a) Median OS for U-CLL: 117 months; median OS for M-CLL 215 months. The difference is significant at the  $P = 0.027$  level (log-rank test). (b) Median TTFT for U-CLL: 29 months; median TTFT for M-CLL: 227 months. The difference is significant at the  $P = 0.0001$  level (log-rank test).

less than 98% was 117 months ( $P = 0.027$ ) (Figure 2(a)). Comparison of TTFT between M-CLL and U-CLL revealed a significantly higher TTFT in M-CLL versus U-CLL (227 and 29 months, resp.,  $P < 0.0001$ ) (Figure 2(b)).

Regarding subfamily usage, it is noteworthy that patients with IGHV1-69 had a higher probability to be treated ( $P = 0.002$ ) and developed more frequently secondary neoplasms ( $P = 0.005$ ). By contrast, patients with IGHV3-07 were associated with a lower WBC count ( $P = 0.001$ ), male sex ( $P = 0.03$ ), and nonprogressive disease ( $P = 0.043$ ). IGHV3-30 usage was associated with normal levels of LDH ( $P = 0.005$ ). Patients expressing IGHV3-11 subfamily had poor or intermediate prognosis cytogenetic alterations in all cases but one including 17p deletion in two patients, 11q deletion in one patient, and trisomy 12 in two other patients.

We failed to correlate the use of IGHV3-21 region with any feature, probably due to the low representation of this subfamily.

Finally, it is remarkable that all patients who expressed IGHV5-51 were males ( $P = 0.048$ ), presented more frequently with positive direct antiglobulin test ( $P = 0.028$ ), and

TABLE 2: Relationship between genomic aberrations, CD38, and mutation status.

FISH	Mutation status	Mutation status		$P$
		M-CLL	U-CLL	
11q deletion	Present	4	17	0.0001
	Absent	121	82	
13q deletion	Present	61	20	0.0001
	Absent	64	79	
17p deletion	Present	0	10	0.0001
	Absent	126	88	
12q trisomy	Present	10	22	0.0003
	Absent	115	77	
CD38*	Present	20	36	0.0001
	Absent	46	19	

\*Performed in 121 patients.

six out of seven showed cytogenetic aberrations including 11q deletion (2 cases), trisomy 12 (2 cases), and 14q32 translocation (1 case).

OS was significantly worse in patients expressing IGHV1-69 ( $P = 0.021$ ) and IGHV3-11 ( $P = 0.025$ ). Significantly differences in prognosis could not be found in other IGHV subgroups, including IGHV5-51 ( $P = 0.057$ ). Regarding patients using IGHV4 family, they had a significantly higher TTFT ( $P = 0.001$ ), with no cases of Richter syndrome in patients with IGHV4-39. Only 29/103 patients expressing IGHV3 received treatment ( $P = 0.016$ ); albeit patients from subfamily IGHV3-21 showed a tendency to be treated earlier. On the other hand, 6/7 cases from family IGHV5 required treatment during followup ( $P = 0.001$ ).

#### 3.4. Genomic Aberrations, CD38, and Mutation Status.

Patients with 13q deletion belonged significantly more frequently to the mutated group ( $P = 0.005$ ). By contrast, high-risk aberrations such as 11q and 17p deletions were significantly associated with the unmutated group ( $P = 0.003$  and  $P = 0.007$ , resp.). Patients with 12q trisomy were also associated with the unmutated group ( $P = 0.003$ ). No relationship between patients without genomic aberrations and mutation status was observed (Table 2).

Data for the expression of CD38 was available for 121 patients. Fifty-six patients were CD38 positive and 65 were negative at a cutoff level for CD38 of 30%. A significant different expression of CD38 between patients with M-CLL (20) and those with U-CLL (36) was observed ( $P = 0.0001$ ) (Table 2).

## 4. Discussion

In patients with CLL, the presence of a correlation between unmutated IGHV status and poor survival has been well established in several studies [7–9]. This has led to extensive investigations on the mutational status and IGHV gene usage in different populations of patients diagnosed with CLL over the last few years. Results from these studies suggest that

the presence of ethnic variations and geographic background may affect IGHV gene usage, in CLL [21–25].

The aim of our study was to investigate the frequency and mutation status of IGHV in a cohort of 224 patients from northwest and central region of Spain and to correlate it with cytogenetic abnormalities, CD38 expression, OS, and TTFT.

We found 56% cases of M-CLL and 44% of U-CLL when we established homology cutoff value on 98%. These findings are consistent with previous publications in Western countries [9, 12, 24]. Our data also confirmed that patients with unmutated IGHV genes had a distinctly more malignant disease and much shorter OS and TTFT than those with somatic mutations.

IGHV gene usage family distribution was also comparable to those observed in Western countries [26], which showed a higher representation of the IGHV3 family followed by IGHV1 and IGHV4 (48.4%, 24.9%, and 18.6%, resp.).

With regard to the IGHV3 family, IGHV3-30 was the most frequently used segment followed by IGHV3-23. By contrast, IGHV3-7 was present in a relatively low frequency (4%) and was seen preferentially in M-CLL (8/9). Similar observations have been reported previously in Mediterranean countries and Serbian patients [12, 24, 27].

IGHV3-21 has been reported to be overrepresented in Scandinavian patients with a lower frequency in Southern European countries and has been associated with poor prognosis independent of mutational status [27, 28]. We only found 3.2% of the cases with this gene usage and 6 out of 7 belonged to the subgroup of M-CLL. Anyway, probably due to the underrepresentation of this gene, we could not see a worse clinical outcome in these patients, although a trend to a shorter TTFT was observed ( $P = 0.07$ ). Studies from Asia [21, 22], South America [23], and Europe [12, 26] showed a low representation of IGHV3-II subfamily, with a similar proportion of M-CLL and U-CLL in this subgroup. However, the Ukrainian group showed that its presence was associated with an increased risk of developing autoimmune hemolytic anemia [25]. Interestingly, in our cohort, IGHV3-II gene was significantly overused in the unmutated group and was associated with a lower OS ( $P = 0.025$ ), but we failed to find a relationship with the risk of developing autoimmune hemolytic anemia. Further study of larger series needs to be performed to validate this data.

IGHV1-69 is the most frequently used gene in IGHV1 gene family of Western populations, exhibiting in most of the cases a germ line profile [29] and, consequently, a more aggressive disease. The higher usage of IGHV1-69 has been reported in Ukrainian [25] and Mediterranean [12] CLL patients. In accordance with these observations, IGHV1-69 was also the most frequently used segment of IGHV1 family in our studied population and the second most commonly detected in the global series (21 cases, 9.4%). We could also confirm the association of IGHV1-69 with U-CLL cases, as 18 of our 21 cases had the unmutated profile ( $P < 0.0001$ ), with a significant worse OS ( $P = 0.021$ ).

IGHV4 family has been reported to be overused in the mutated subgroup of CLL [26]. In keeping with these findings, we confirmed the significantly preferential use of IGHV4 family in M-CLL ( $P = 0.02$ ) and the consequently

better outcome of this subgroup with a longer TTFT ( $P = 0.001$ ). IGHV4-34 had previously been reported to be among the most frequently used genes in CLL rearrangements [12]. In our cohort, IGHV4-34 was used in 8.3% of the patients, similar to previously described in Mediterranean patients [30].

Regarding the remaining genes, we found a low representation of IGHV5, IGHV2, and IGHV7 gene families and lack of expression of IGHV6, as also described in other studies, regardless of their ethnic origin [23]. However, it is remarkable that, within the IGHV5 family, IGHV5-51 was used in 8 patients (3.2%); all of them were male and presented with a shorter TTFT ( $P = 0.01$ ). We could not confirm that these patients had a worse prognosis, probably due to its low representation. Further series including more patients with this subfamily should be studied in the future to clarify these findings. The Serbian cohort [24] and the Mediterranean cohort [12] are the ones with more representation of this subfamily and showed only 2% of this usage. Contrary to our findings, they did not find differences in prognosis and mutation status in this subgroup, probably due to the low representation of this usage. Nevertheless, further studies of larger series need to be performed.

Del(13q), del(11q), +12, del(17p), and IGH rearrangement have been proved to be the most common and prognostically relevant chromosomal changes in CLL. As previously reported [9], we confirmed that del(13q) was the most prevalent genetic abnormality and was found more often in patients with M-CLL, confirming its more favorable clinical outcome. Our data also showed an association between high-risk aberrations del(11q), +12, and del(17p) and U-CLL, which is consistent with their poor clinical outcome [31].

CD38 has also been reported as an independent predictor of prognosis for CLL, and its high expression has been correlated to unfavorable outcomes. It is controversial whether high levels of CD38 expression may be used as a surrogate marker of mutation status [22]. However, in our study we found an association of CD38 and U-CLL.

## 5. Conclusions

Our data confirm that IGHV mutation status is one of the most significant molecular predictors for CLL prognosis. The identification of IGHV gene segments can provide additional information regarding clinical course of CLL. The use of IGHV3-21 had a low incidence in our series. IGHV3-II identified a group of patients with poor prognosis. IGHV5-51 revealed a group of patients with a trend to a worse outcome. In addition, OS and TTFT were significantly related to IGHV mutation status. Further studies of larger series, preferably in the context of prospective clinical trials, need to be performed to validate our data.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

The study was partially supported by grants from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias 02/1041, FIS 09/01382, FIS 09/01543, and PI12/00281; RD12/0036/0069 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness & European Regional Development Fund (ERDF) “Una manera de hacer Europa”; and Caja de Burgos-Banca Cívica. A. Rodríguez was fully supported by an Ayuda Predoctoral FIS de Formación en Investigación by the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias. M. Hernández-Sánchez was partially supported by a grant from the “Fundación Española de Hematología y Hemoterapia.” Partially supported by grants from “Proyectos de Investigación Biomédica del SACYL” 106/A/06, the authors thank all the physicians from the Spanish hospitals who contributed with the clinical data; Eva Lumbreras, María Pozo, Teresa Prieto, María Ángeles Hernández, Ana Simón, Ana Díez, and Almudena Martín, from “Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca”; and Alicia Antón from IBSAL-Hospital Universitario de Salamanca for the technical assistance.

## References

- [1] G. Dighiero and T. Hamblin, “Chronic lymphocytic leukaemia,” *The Lancet*, vol. 371, no. 9617, pp. 1017–1029, 2008.
- [2] J. A. Hernández, M. González, and J. M. Hernández, “Chronic lymphocytic leukemia,” *Medicina Clínica*, vol. 135, no. 4, pp. 172–178, 2010.
- [3] K. R. Rai, A. Sawitsky, and E. P. Cronkite, “Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia,” *Blood*, vol. 46, no. 2, pp. 219–234, 1975.
- [4] J. L. Binet, A. Auquier, G. Dighiero et al., “A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis,” *Cancer*, vol. 48, no. 1, pp. 198–206, 1981.
- [5] M. Crespo, E. Bosch, N. Villamor et al., “ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 18, pp. 1764–1775, 2003.
- [6] A. E. Rodríguez-Vicente, M. G. Díaz, and J. M. Hernández-Rivas, “Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease,” *Cancer Genetics*, vol. 206, no. 3, pp. 49–62, 2013.
- [7] N. Chiorazzi, “Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia,” *Hematology*, vol. 2012, pp. 76–87, 2012.
- [8] R. N. Damle, T. Wasil, F. Fais et al., “Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia,” *Blood*, vol. 94, no. 6, pp. 1840–1847, 1999.
- [9] T. J. Hamblin, Z. Davis, A. Gardiner, D. G. Oscier, and F. K. Stevenson, “Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia,” *Blood*, vol. 94, no. 6, pp. 1848–1854, 1999.
- [10] J. A. Hernández, A. E. Rodríguez, M. González et al., “A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia,” *Haematologica*, vol. 94, no. 3, pp. 364–371, 2009.
- [11] H. Döhner, S. Stilgenbauer, A. Benner et al., “Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 343, no. 26, pp. 1910–1916, 2000.
- [12] P. Ghia, K. Stamatopoulos, C. Belessi et al., “Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene,” *Blood*, vol. 105, no. 4, pp. 1678–1685, 2005.
- [13] I. Panovska-Stavridis, M. Ivanovski, N. Siljanovski, L. Cevreska, and D. G. Efremov, “Chronic lymphocytic leukemia patients with a V1-69 gene rearrangement do not have inferior survival with respect to patients that express other unmutated VH genes,” *Leukemia Research*, vol. 31, no. 2, pp. 245–248, 2007.
- [14] M. Thorsélius, A. Kröber, F. Murray 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*, vol. 107, no. 7, pp. 2889–2894, 2006.
- [15] N. L. Harris, E. S. Jaffe, J. Diebold 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,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 17, no. 12, pp. 3835–3849, 1999.
- [16] B. D. Cheson, J. M. Bennett, M. Grever et al., “National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment,” *Blood*, vol. 87, no. 12, pp. 4990–4997, 1996.
- [17] P. Ghia, K. Stamatopoulos, C. Belessi et al., “ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia,” *Leukemia*, vol. 21, no. 1, pp. 1–3, 2007.
- [18] J. J. M. van Dongen, A. W. Langerak, M. Brüggemann 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*, vol. 17, no. 12, pp. 2257–2317, 2003.
- [19] M. B. González, J. M. Hernández, J. L. García et al., “The value of fluorescence in situ hybridization for the detection of 11q in multiple myeloma,” *Haematologica*, vol. 89, no. 10, pp. 1213–1218, 2004.
- [20] S. Quijano, A. López, A. Rasillo et al., “Association between the proliferative rate of neoplastic B cells, their maturation stage, and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: analysis of a series of 432 patients,” *Blood*, vol. 111, no. 10, pp. 5130–5141, 2008.
- [21] M. Hojjat-Farsangi, M. Jeedi-Tehrani, S. M. Razavi et al., “Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage and mutational status of the leukemic B cells in Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia,” *Cancer Science*, vol. 100, no. 12, pp. 2346–2353, 2009.
- [22] L. Chen, Y. Zhang, W. Zheng et al., “Distinctive IgVH gene segments usage and mutation status in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia,” *Leukemia Research*, vol. 32, no. 10, pp. 1491–1498, 2008.
- [23] C. Stanganelli, A. Travella, R. Bezares, and I. Slavutsky, “Immunoglobulin gene rearrangements and mutational status in argentinian patients with chronic lymphocytic leukemia,” *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, vol. 13, no. 4, pp. 447.e2–457.e2, 2013.

- [24] T. Karan-Djurasevic, V. Palibrk, T. Kostic et al., "Mutational status and gene repertoire of IGHV-IGHD-IGHJ rearrangements in Serbian patients with chronic lymphocytic leukemia," *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, vol. 12, no. 4, pp. 252–260, 2012.
- [25] I. Kryachok, I. Abramenko, N. Bilous, A. Chumak, Z. Martina, and I. Filonenko, "IGHV gene rearrangements as outcome predictors for CLL patients: experience of Ukrainian group," *Medical Oncology*, vol. 29, no. 2, pp. 1093–1101, 2012.
- [26] P. M. Donisi, N. Di Lorenzo, M. Riccardi et al., "Pattern and distribution of immunoglobulin VH gene usage in a cohort of B-CLL patients from a northeastern region of Italy," *Diagnostic Molecular Pathology*, vol. 15, no. 4, pp. 206–215, 2006.
- [27] R. Bomben, M. Dal Bo, D. Capello et al., "Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study," *Blood*, vol. 109, no. 7, pp. 2989–2998, 2007.
- [28] N. Cahill, L. A. Sutton, M. Jansson et al., "IGHV3-21 gene frequency in a Swedish cohort of patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia," *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, vol. 12, no. 3, pp. 201–206, 2012.
- [29] K. N. Potter, J. Orchard, E. Critchley, C. I. Mockridge, A. Jose, and F. K. Stevenson, "Features of the overexpressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire," *Blood*, vol. 101, no. 8, pp. 3082–3084, 2003.
- [30] L.-A. Sutton, E. Kostareli, A. Hadzidimitriou et al., "Extensive intraclonal diversification in a subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with stereotyped IGHV4-34 receptors: implications for ongoing interactions with antigen," *Blood*, vol. 114, no. 20, pp. 4460–4468, 2009.
- [31] D. E. Gladstone, A. Blackford, E. Cho et al., "The importance of IGHV mutational status in del(11q) and del(17p) chronic lymphocytic leukemia," *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, vol. 12, no. 2, pp. 132–137, 2012.

# 5 ARTÍCULO 2: A high proportion of cells carrying trisomy 12 is associated with a worse outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia

I. González-Gascón y Marín, M. Hernández-Sánchez, A.-E. Rodríguez-Vicente, C. Sanzo, A. Aventín, A. Puiggros, R. Collado, C. Heras, C. Muñoz, J. Delgado, M. Ortega, M.-T. González, I. Marugán, I. de la Fuente, I. Recio, F. Bosch, B. Espinet, M. González, J.-M. Hernández-Rivas, J.-Á. Hernández, on behalf of Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC) and Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH)

Hematological Oncology, Volume 34, Issue 2, Pages 84–92, June 2016.

*El material suplementario al que se hace referencia en el artículo se encuentra en el Anexo A del presente documento.*





Original Research Article

## A high proportion of cells carrying trisomy 12 is associated with a worse outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia

Isabel González-Gascón y Marín<sup>1</sup>, María Hernández-Sánchez<sup>2,3</sup>, Ana-Eugenia Rodríguez-Vicente<sup>2,3</sup>, Carmen Sanzo<sup>4</sup>, Anna Aventín<sup>5</sup>, Anna Puiggros<sup>6</sup>, Rosa Collado<sup>7</sup>, Cecilia Heras<sup>1</sup>, Carolina Muñoz<sup>1</sup>, Julio Delgado<sup>8</sup>, Margarita Ortega<sup>9</sup>, María-Teresa González<sup>10</sup>, Isabel Marugán<sup>11</sup>, Ignacio de la Fuente<sup>12</sup>, Isabel Recio<sup>13</sup>, Francesc Bosch<sup>9</sup>, Blanca Espinet<sup>6</sup>, Marcos González<sup>2,3</sup>, Jesús-María Hernández-Rivas<sup>2,3</sup>, José-Ángel Hernández<sup>1,14\*</sup>, On behalf of Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC) and Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH)

<sup>1</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Servicio de Hematología, IBSAL-Hospital Universitario de Salamanca, Spain

<sup>3</sup>Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC, Universidad de Salamanca (USAL-CSIC), Spain

<sup>4</sup>Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>5</sup>Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>6</sup>Hospital del Mar, Barcelona, Spain

<sup>7</sup>Hospital General, Valencia, Spain

<sup>8</sup>Hospital Clinic i Provincial, Spain

<sup>9</sup>Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>10</sup>Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Spain

<sup>11</sup>Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>12</sup>Hospital Rio Hortega, Valladolid, Spain

<sup>13</sup>Hospital Nuestra Señora de Sonsoles, Avila, Spain

<sup>14</sup>Universidad Complutense, Madrid, Spain

\*Correspondence to:

José-Ángel Hernández, Servicio de Hematología, Departamento de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Hospital Universitario Infanta Leonor, C/ Gran Vía del Este 80, 28031 Madrid, Spain.  
E-mail: jahernandezr@salud.madrid.org

### Abstract

**The prognosis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients displaying trisomy 12 (+12) remains unclear. In this study, we analyzed the influence of the proportion of cells with +12, and other clinical and biologic factors, in time to first therapy (TTFT) and overall survival (OS), in 289 patients diagnosed with CLL carrying +12. Median OS was 129 months. One hundred seventy-four patients (60.2%) presented +12 in <60% of cells. TTFT and OS for this subgroup were longer than for the subgroup with +12 in ≥60% of cells, with a median TTFT of 49 months (CI95%, 39–58) vs 30 months (CI95%, 22–38) ( $P=0.001$ ); and a median OS of 159 months (CI95%, 119–182), vs 96 months (CI95%, 58–134) ( $P=0.015$ ). Other factors associated with a shorter TTFT were: Binet stage, B symptoms, lymphadenopathy, splenomegaly, high lymphocyte count, 11q-, high  $\beta_2$ microglobulin, and high LDH. In the multivariate analysis, clinical stage, +12 in ≥60% of cells, high lymphocyte count, B symptoms, and 11q- in addition, resulted of significance in predicting shorter TTFT. Significant variables for OS were: Binet stage, lymphadenopathy, splenomegaly, high LDH, high  $\beta_2$ microglobulin, 11q-, and CD38. In the multivariate analysis, only Binet stage, 11q-, and high  $\beta_2$ microglobulin significantly predicted shorter OS. CLL with +12 entails a heterogeneous group with intermediate prognosis. However, a high proportion of cells carrying +12 separates a subgroup of patients with poor outcome. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.**

**Keywords:** chronic lymphocytic leukemia; +12; prognosis

Received 23 November 2014  
Revised 19 January 2015  
Accepted 21 January 2015

### Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a heterogeneous disease, with survival times ranging from months to decades [1–3]. Clonal genomic aberrations can be

identified in approximately 80% of CLL patients by fluorescent *in situ* hybridization (FISH), and they constitute one of the most important predictors of disease progression and survival. The most common recurrent chromosomal abnormalities include: 13q deletion (13q-); 11q deletion

(11q-); trisomy 12 (+12); and 17p deletion (17p-), defining five prognostic categories with survival times ranging from 32 months in patients with 17p- to 133 months in patients with 13q- as the sole abnormality [4]. Recently, a new prognostic scoring system which separates CLL patients into four prognostic risk groups has been published: high-risk, harboring *TP53* and/or *BIRC3* abnormalities (10-year OS: 29%); intermediate-risk, harboring *NOTCH1* and/or *SF3B1* mutations and/or del(11q22-q23) (10-year OS: 37%); low-risk, harboring trisomy 12 or a normal genetics (10-year OS: 57%); and very low-risk, harboring del(13q) only, whose 10-year OS (69.3%) did not significantly differ from a matched general population [5].

Trisomy 12 is the third most frequent cytogenetic aberration in CLL, occurring in up to 15–20%. It often appears as the unique cytogenetic alteration (40–70% of cases with +12), although it can be associated with other chromosomal aberration [6].

The critical genes involved in this aberration remain unknown [7], and it has been associated with an atypical morphology or immunophenotype [8]. CLL patients with this aberration have been classically considered to have an intermediate prognosis [4], although evidence from prospective trials suggests that overall survival is favorable despite progression-free survival may be shorter [7,9].

CLL patients with +12 rarely show *TP53* mutations and rarely acquire these over time, finding that may partly explain the benign course after treatment [5,10]. However, the presence of *NOTCH-1* mutations can be identified in 30–40% of patients carrying +12, and it confers a worse disease outcome in this subset of patients [11–14].

Several studies demonstrated that the presence of a specific cytogenetic abnormality is not sufficient to identify homogeneous subgroups of patients. Thus, a high proportion of cells carrying 13q14-, or large deletions including *RB1* gene are associated with a worse outcome [15–18]. Similar results have been observed regarding 11q-, with a negative prognostic impact when 11q- involves the majority of CLL clone [19], and regarding 17p-, with a worse clinical outcome when a higher percentage of deleted cells is present [20]. Therefore, a multicenter analysis including 289 patients diagnosed with CLL harboring +12 was carried out. We described and compared the clinical and biological characteristics of these patients and found that a high number of +12 lymphocytes has a bad impact in the clinical outcome.

## Patients and methods

### Patients

An electronic database containing information from 2561 patients diagnosed with CLL from 25 Spanish institutions

was retrospectively screened. The diagnosis was based according to the World Health Organization Classification of Tumors [21] and International Workshop on CLL guidelines [22]. All (289) cases carrying +12 detected in the routine FISH analysis were selected. Clinical information recorded at diagnosis included age, Binet stage, and physical examination. Analytical parameters included absolute white blood cell and lymphocyte counts, serum lactate dehydrogenase (LDH), and serum beta2-microglobulin (B2M) concentrations. Prognostic factors such as CD38, *ZAP70* expression, and mutational status of immunoglobulin heavy chain (IGHV) were collected when available. The study was approved by the local ethics committee, and all individuals provided their informed consent.

### FISH analysis

Interphase FISH was performed on peripheral blood samples at the time of diagnosis using commercially available probes for the following regions: 11q22/ATM, 12q13, 13q14, and 17p13/TP53 (Vysis/Abbott Co, Downers Grove, IL, USA). Methods for FISH analysis are described elsewhere [23]. Dual color FISH using differently labeled control probes was performed, and signal screening was carried out on at least 200 cells with well delineated signals. Hybridization was repeated in those slides with less than 80% cells showing two control-probe signals. The sensitivity limit for the detection of +12 and deletions were >5%, and >10% interphase cells with three signals and one signal, respectively.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 21.0 software package (SPSS, Chicago, IL, USA). The cut-off point for percentage of +12 was selected by dividing the variable into deciles and selecting the most efficient cut-point. The Fischer's exact test and the Chi-squared test were used to determine the relationship between categorical variables. Quantitative variables were compared by using the Student *t* test and the Mann-Whitney *U* test.

OS was calculated from the time of diagnosis to death or last follow-up visit. TTFT was calculated as the interval between diagnosis and the start of first line treatment. OS and TTFT were estimated by the Kaplan-Meier method and assessed by the log-rank test. Univariate and multivariate analyses were performed using Cox regression method. Statistical significance was defined as  $P < 0.05$ .

## Worse prognosis in CLL patients with a high number +12 cells

### Results

#### Patient characteristics

FISH detected +12 in 355 patients (13.9%) of the 2561 patients initially included in the study. The final analysis was limited to 289 cases, after excluding monoclonal B-cell lymphocytosis, cases that acquired +12 as clonal evolution, or with inadequate follow-up. Median age was 68 years old (range, 22–88 years). A hundred and seventy-eight patients were male (61.6%). At the time of diagnosis, most cases were classified as stage A (68.9%), while only 5.2% were in stage C according to Binet classification [3]. Median white blood cell (WBC) count was  $19 \times 10^9/L$ , and only 16.3% of patients presented with  $>30 \times 10^9/L$  lymphocytes. Splenomegaly, hepatomegaly, and lymph node involvement were present in 15.5%, 5.7%, and 54.1%, respectively. Regarding *IGHV* mutation status, 53.8% of the patients were classified as unmutated. CD38 and ZAP-70 were positive in 37.4%, and 55.8% of the patients, respectively. Multiple genetic abnormalities detected by FISH were present in 56 cases including: 11q- (3.9%), 13q- (17%), and 17p- (6.1%). Of the patients, 78.2% were alive at the time of analysis, and median follow-up was 41 months (range 1–197 months).

The impact of proportion of cells with +12 on prognosis was assessed by dividing cases into different cutoff values, and we found 60% as the best predictive cut-off value to divide patients with different clinical outcomes. A total of 174 patients (60.2%) presented the +12 in  $<60\%$  of cells; whereas the remaining 115 patients (39.8%) carried +12 in  $\geq 60\%$  of cells. Cases with a higher ( $\geq 60\%$ ) proportion of cells with +12, presented with a higher WBC ( $P=0.001$ ), lymphocyte count ( $P=0.006$ ), LDH ( $P=0.03$ ), size of spleen ( $P=0.001$ ), and more advanced Binet stage ( $P=0.04$ ) (Table 1).

#### Time to first therapy

In our cohort of 289 patients, 175 (60.6%) were treated during follow-up, and median TTFT was 42 months (CI95%, 34–49 months). Of the patients in the group with lower proportion of +12, 51.2% required treatment, compared with 75.7% of patients in the group with  $\geq 60\%$  of cells showing +12 ( $P < 0.001$ ).

As shown in Figure 1, we found that median TTFT was 49 months (CI95%, 39–58 months) in cases with +12 in  $<60\%$  of cells compared with 30 months (CI95%, 22–38 months) in cases with  $\geq 60\%$  ( $P=0.001$ ). Other significant prognostic variables for TTFT in the univariate analysis were (Figure 1B–H): Binet stage ( $P < 0.0001$ ), B symptoms ( $P < 0.0001$ ), lymphadenopathy ( $P < 0.0001$ ), splenomegaly ( $P < 0.0001$ ), high lymphocyte count ( $P < 0.0001$ ), high B2M ( $P=0.02$ ), and high LDH

( $P=0.01$ ) (Table 2). In the multivariate analysis, a shorter TTFT was predicted by Binet stage ( $P=0.002$ ),  $\geq 60\%$  of cells with +12 ( $P=0.013$ ), high lymphocyte count ( $P=0.04$ ), B symptoms ( $P=0.009$ ), and 11q- in addition to +12 ( $P=0.002$ ) (Table 3).

#### Overall survival

At the time of analysis, 69 patients (21.8%) had died. Median OS was 129 months (CI95%, 100–158 months). A total of 16.7% of patients in the group with lower proportion of +12 died compared with 29.6% of patients in the group with  $\geq 60\%$  of cells showing +12 ( $P=0.009$ ) (Table 1).

Regarding OS based on the percentage of cells with +12, cases with less than 60% of cells with +12 had a significantly longer OS, 159 months (CI95%, 119–182 months) compared to patients with a higher proportion of cells carrying +12, 96 months (CI95%, 58–134 months) ( $P=0.015$ ) (Figure 2A). Other variables that also showed a significant impact in OS in the univariate analysis were (Figure 2B–G): advanced Binet stage ( $P < 0.0001$ ), lymphadenopathy ( $P=0.001$ ), splenomegaly ( $P=0.001$ ), high LDH ( $P=0.009$ ), high ( $P < 0.0001$ ), and CD38 ( $P=0.04$ ) (Table 4). In the multivariate analysis, only Binet stage ( $P=0.04$ ), 11q- in addition to +12 ( $P=0.01$ ), and high B2M ( $P=0.03$ ) resulted significant in predicting a shorter OS (Table 5).

#### Sole +12 compared with additional cytogenetic abnormalities

In our group of 289 patients harboring +12, 56 cases (19%) presented additional cytogenetic abnormalities distributed as detailed as follows: 13q- ( $n=34$ ); 17p- ( $n=11$ ); 11q- ( $n=5$ ); 11q- and 13q- ( $n=3$ ); 17p- and 13q- ( $n=2$ ); and 17p- and 11q- ( $n=1$ ); (Supporting information Table S1). Distribution between the different cytogenetic subgroups and the percentage of cells with +12 was similar, as shown in Table 1.

TTFT was shorter in the group of cases with +12 and 11q- compared with cases with +12 as a unique aberration (23 months [CI95%, 9–37] vs 44 months [CI95%, 36–52] [ $P=0.02$ ]) (Supporting information Figure S1A). A shorter OS was observed when simultaneous +12 and 11q- were present (44 months [CI95%, 26–62] vs 159 months [CI95%, 92–226] [ $P=0.02$ ]) (Supporting information Figure S1B).

We could not find any difference in TTFT or OS when +12 was accompanied by 17p- or 13q-. It is remarkable that most of the patients with 11q- (7/9) presented it in  $\geq 25\%$  of 11q deleted nuclei.

## 5. Artículo 2: A high proportion of cells carrying trisomy 12 is associated with a worse outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia

I González-Gascón y Marín et al.

**Table 1.** Clinical and biological characteristics of the whole series of 289 patients with +12 at diagnosis, according to the percentage of cells with +12 detected by FISH: <60% or ≥60%

Characteristic	+12 < 60% n = 174	+12 ≥ 60% n = 115	P value	Global series	%
Age, years; median (range)	69 (34–88)	68 (25–87)	0.56	68 (25–88)	
Sex					
Male	104	74	0.45	178	61.6
Female	70	41		111	38.4
White blood cells (n = 281), (range) × 10 <sup>9</sup> /L	16.2 (4.5–294.2)	23.8 (5.9–276.0)	0.001	19.0 (4.5–294.2)	
Lymphocytes (n = 279)					
≤30 × 10 <sup>9</sup> /L	149	86	0.006	232	83.2
>30 × 10 <sup>9</sup> /L	20	27		47	16.8
LDH (n = 276)					
Normal	114	59	0.03	173	62.7
High	54	49		103	37.3
β <sub>2</sub> microglobulin (n = 246)					
Normal	110	65	0.08	175	71.1
High	36	35		71	28.9
Binet stage (n = 280)					
A	128	71	0.04	199	71.1
B	34	32		66	23.6
C	6	9		15	5.4
Lymphadenopathy (n = 244)					
No	70	42	0.34	112	45.9
≤2 areas	31	22		53	21.7
>2 areas	42	37		79	32.4
Splenomegaly (n = 279)					
Yes	15	28	0.001	43	15.5
No	152	84		236	84.5
Hepatomegaly (n = 278)					
Yes	7	9	0.38	262	5.7
No	160	102		16	94.3
IGHV mutation status (n = 80)					
Mutated	22	19	0.74	37	46.3
Unmutated	24	15		43	53.8
CD38 (n = 190)					
Positive	43	28	0.99	71	37.4
Negative	71	48		119	62.6
ZAP-70 (n = 95)					
Positive	32	21	0.91	53	55.8
Negative	24	18		42	44.2
Therapy during follow-up (n = 287)					
Yes	88	87	<0.001	175	61
No	84	28		112	39
Died during follow-up					
Yes	29	34	0.009	63	21.8
No	145	81		226	78.2
Other FISH abnormalities					
11q- (n = 225)	7	2	0.2	9	3.9
13q- (n = 225)	22	17	0.5	39	17
17p- (n = 224)	10	4	0.3	14	6.1

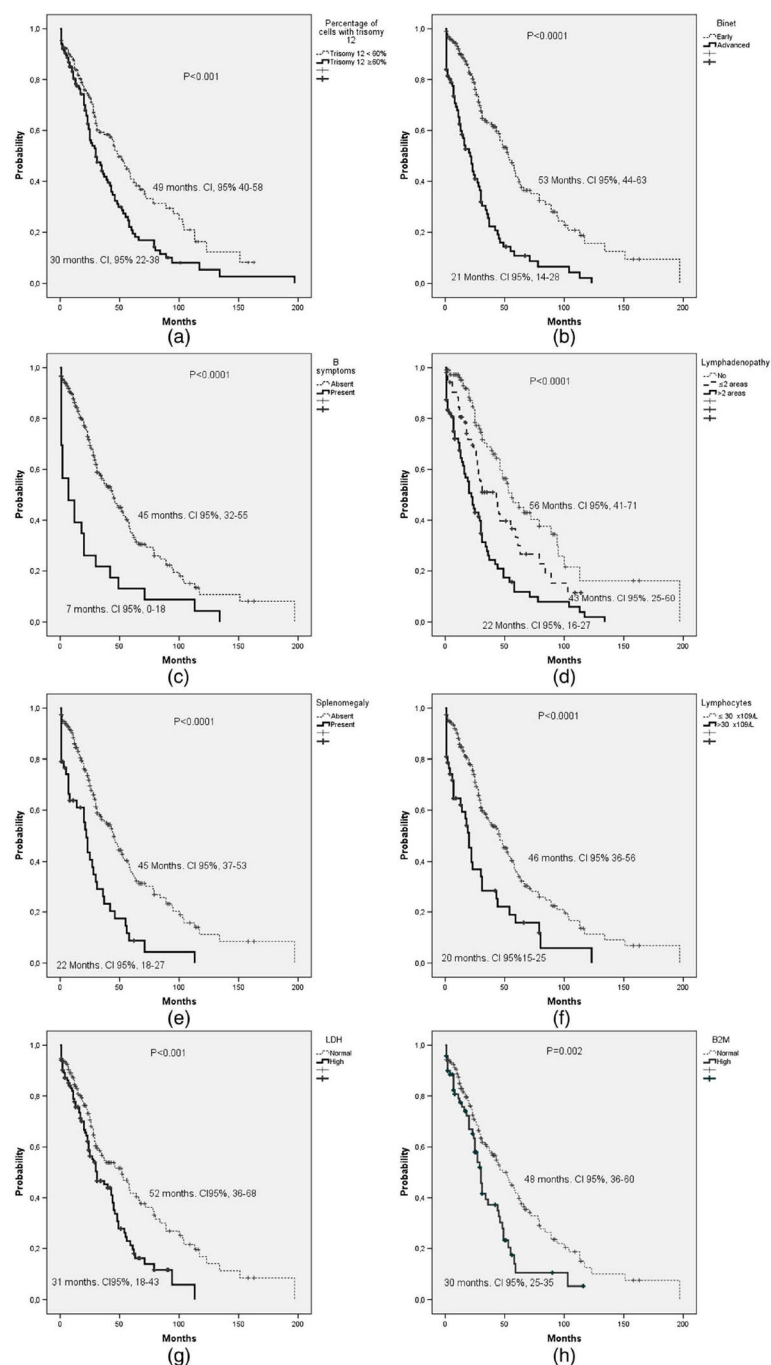
### Discussion

Cytogenetic abnormalities confer an important prognostic value in CLL [3]. However, recent studies have demonstrated that cytogenetic groups might be heterogeneous, and that the percentage of cells that display a specific abnormality could be related to the prognosis of these subgroups [15,19,20]. These observations have not been confirmed before in patients carrying +12. For these

reasons, we performed a multicentric analysis of patients diagnosed with CLL and +12 focusing on the prognostic value that the percentage of cells with this abnormality may imply. We observed that patients with +12 constitute a heterogeneous group with intermediate prognosis, with a poor outcome in the subgroup of patients with a higher proportion of cells carrying +12.

Trisomy 12 was present in 13.5% of the patients, being the median OS of 129 months, and median TTFT of

## Worse prognosis in CLL patients with a high number +12 cells



**Figure 1.** a) Kaplan–Meier curve for time to first therapy (TTFT) in 289 patients with +12 and percentage of +12 (< vs ≥60%) (A); ( $P < 0.005$ ; log-rank test). b) Kaplan–Meier curve for time to first therapy (TTFT) in 289 patients with +12 and Binet stage (B) ( $P < 0.005$ ; log-rank test). c) Kaplan–Meier curve for time to first therapy (TTFT) in 289 patients with +12 and B symptoms ( $P < 0.005$ ; log-rank test). d) Kaplan–Meier curve for time to first therapy (TTFT) in 289 patients with +12 and lymphadenopathy (D) ( $P < 0.005$ ; log-rank test). e) Kaplan–Meier curve for time to first therapy (TTFT) in 289 patients with +12 and splenomegaly (E) ( $P < 0.005$ ; log-rank test). f) Kaplan–Meier curves for time to first therapy (TTFT) in 289 patients with +12 and lymphocyte count (F) ( $P < 0.005$ ; log-rank test). g) Kaplan–Meier curve for time to first therapy (TTFT) in 289 patients with +12 and LDH (G) ( $P < 0.005$ ; log-rank test). h) Kaplan–Meier curve for time to first therapy (TTFT) in 289 patients with +12 and  $\beta_2$ microglobulin (B2M) (H) ( $P < 0.005$ ; log-rank test)

## 5. Artículo 2: A high proportion of cells carrying trisomy 12 is associated with a worse outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia

I González-Gascón y Marín et al.

**Table 2.** Univariate Cox regression analysis of time to first therapy (TTFT)

Variable		Median TTFT (months)	95%CI	P value
Percentage of cells with +12	<60%	49	40–58	0.001
	≥60%	30	22–38	
Sex	Male	33	24–42	0.2
	Female	46	39–53	
Lymphocytes	≤30 × 10 <sup>9</sup> /L	46	36–56	<0.0001
	>30 × 10 <sup>9</sup> /L	20	15–25	
B symptoms	Absent	45	32–55	<0.0001
	Present	7	0–18	
Lactate dehydrogenase	Normal	52	36–68	0.001
	High	31	18–43	
β <sub>2</sub> microglobulin	Normal	48	36–60	0.002
	High	30	25–35	
Binet stage	Early	53	44–63	<0.0001
	Advanced	21	14–28	
Lymphadenopathy	No	56	41–71	<0.0001
	≤2 areas	43	25–60	
Splenomegaly	>2 areas	22	16–27	<0.0001
	Absent	45	37–53	
Hepatomegaly	Present	22	18–27	0.7
	Yes	40	31–49	
IGHV mutation status	No	37	24–50	0.07
	Yes	52	17–87	
CD38	Yes	31	23–38	0.1
	Negative	48	40–56	
ZAP-70	Positive	30	18–42	0.4
	Negative	42	16–68	
13q-	Positive	37	23–51	0.2
	Absent	49	38–59	
11q-	Present	37	26–47	0.002
	Absent	23	9–37	
17p-	Present	44	36–52	0.3
	Absent	42	20–64	
		44	35–53	

95% CI, 95% confidence interval.

**Table 3.** Multivariate Cox regression of time to first therapy (TTFT)

Variable	Hazard ratio	95%CI	P value
+12 ≥ 60% of cells	1.739	1.126–2.687	0.013
Lymphocytes >30 × 10 <sup>9</sup> /L	1.801	1.025–3.162	0.041
B symptoms	3.038	1.315–7.018	0.009
High β <sub>2</sub> microglobulin	1.426	0.857–2.374	0.17
Advanced Binet stage	2.120	1.311–3.429	0.002
High LDH	1.065	0.684–1.660	0.78
Splenomegaly	0.489	0.201–1.188	0.11
11q-	4.327	1.737–10.782	0.002

95% CI, 95% confidence interval

42 months. These findings are consistent with previous publications that estimate frequency of +12 around 15–20%, with a median OS of 111 months, and a median TTFT of 32 months [4]. The other clinical characteristics of the present series, such as the median age (68 years), with a male predominance; the predominance of low

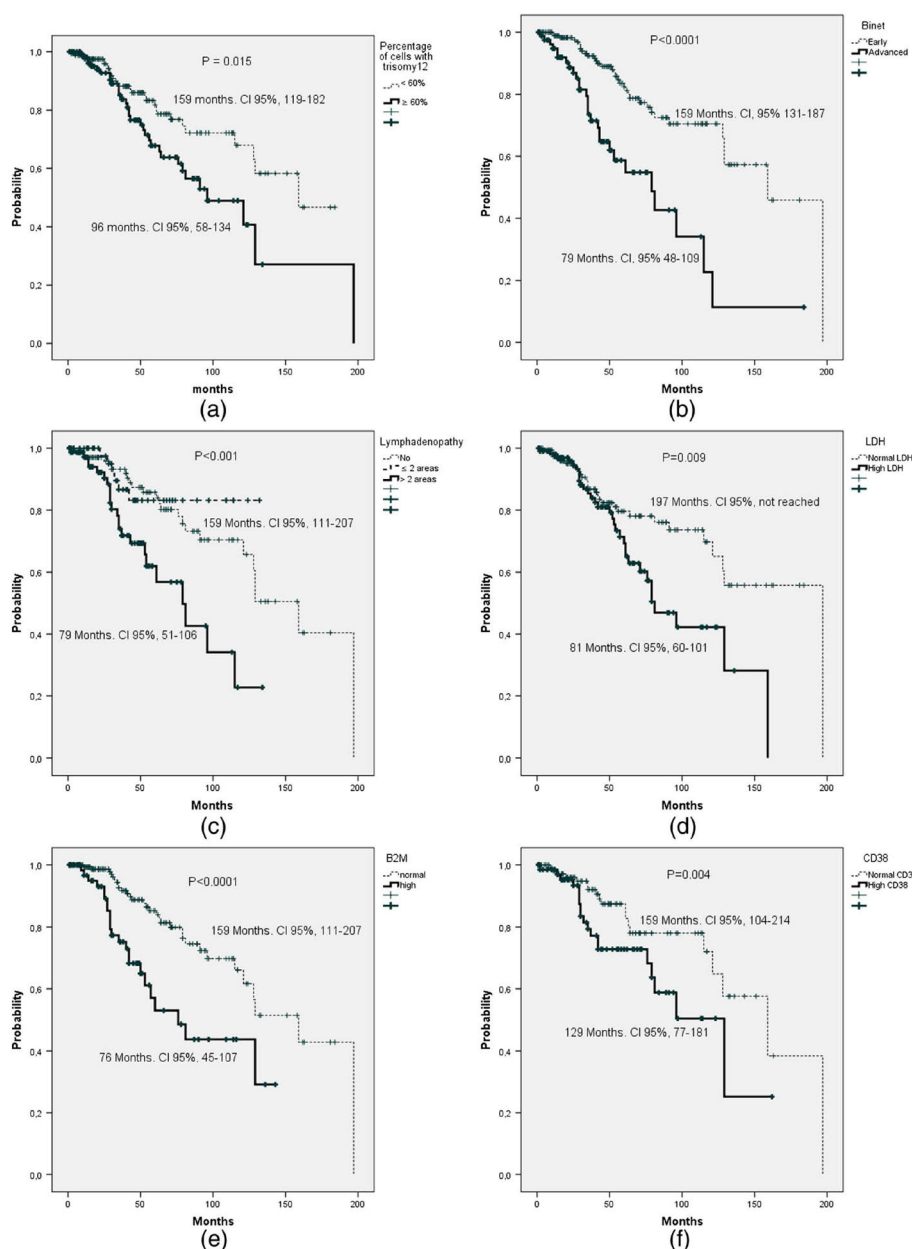
lymphocyte count (83%), low β<sub>2</sub>microglobulin levels (71%), early Binet stages (71%), low levels of CD38 (63%), and absence of significant organomegaly, are also in accordance to previous studies [4,7].

The percentage of cells displaying +12 identified 2 subgroups of patients with different prognosis. Interestingly, patients with a higher proportion of +12 cells presented with higher WBC and lymphocyte count; higher levels of LDH and β<sub>2</sub>microglobulin; more advanced Binet stages; and splenomegaly. More patients with a high proportion of cells with +12 needed treatment or died during follow-up.

Of note, the group of patients with +12 in <60% of their cells, showed a significantly longer TTFT and OS. Moreover, in the multivariate analysis, the independent effect of this covariate remained on TTFT.

To better define prognostic features among all the group of patients with +12, several factors predicting a shorter TTFT were identified. Thus, advanced Binet clinical stage, B symptoms, lymphadenopathy, splenomegaly, high

## Worse prognosis in CLL patients with a high number +12 cells



**Figure 2.** a) Kaplan–Meier curve for overall survival (OS) in 289 patients with +12 and percentage of +12 (< vs  $\geq 60\%$ ) (A) ( $P < 0.005$ ; log-rank test). b) Kaplan–Meier curve for overall survival (OS) in 289 patients with +12 and Binet stage (B); ( $P < 0.005$ ; log-rank test). c) Kaplan–Meier curve for overall survival (OS) in 289 patients with +12 and lymphadenopathy (C); ( $P < 0.005$ ; log-rank test). d) Kaplan–Meier curve for overall survival (OS) in 289 patients with +12 and LDH (D); ( $P < 0.005$ ; log-rank test). e) Kaplan–Meier curve for overall survival (OS) in 289 patients with +12 and  $\beta_2$ microglobulin (B2M) (E) ( $P < 0.005$ ; log-rank test). f) Kaplan–Meier curve for overall survival (OS) in 289 patients with +12 and CD38 (F) ( $P < 0.005$ ; log-rank test)

lymphocyte count, and high LDH were associated with shorter TTFT. It is remarkable that the presence of  $>60\%$  of cells with +12, advanced Binet stage, high lymphocyte count, and B symptoms remained significantly associated with a worse TTFT in the multivariate analysis. These

results are similar to the published studies in the overall setting of CLL cases [4,8,13].

We also found that similar factors were associated with a shorter OS, including advanced Binet stage, lymphadenopathy, splenomegaly, high LDH, high  $\beta_2$ microglobulin,

## 5. Artículo 2: A high proportion of cells carrying trisomy 12 is associated with a worse outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia

I González-Gascón y Marín et al.

**Table 4.** Univariate Cox regression analysis of overall survival (OS)

Variable		Median OS (months)	95%CI	P value
Percentage of cells with +12	<60%	159	100–148	0.015
	≥60%	96	58–134	
Sex	Male	129	82–176	0.9
	Female	129	Not reached	
Lymphocytes	≤30 × 10 <sup>9</sup> /L	129	102–156	0.05
	>30 × 10 <sup>9</sup> /L	96	55–137	
B symptoms	Absent	129	118–140	0.3
	Present	Not reached	Not reached	
Lactate dehydrogenase	Normal	197	Not reached	0.009
	High	81	60–101	
β <sub>2</sub> microglobulin	Normal	159	111–207	<0.0001
	High	76	45–107	
Binet stage	Early	159	131–187	<0.0001
	Advanced	79	48–109	
Lymphadenopathy	No	159	123–195	0.001
	>2 areas	79	51–106	
Splenomegaly	Absent	129	102–155	0.001
	Present	121	Not reached	
Hepatomegaly	Yes	129	101–157	0.2
	No	Not reached	Not reached	
IGHV mutation status	Yes	159	Not reached	0.6
	No	Not reached	Not reached	
CD38	Negative	159	104–214	0.04
	Positive	129	77–181	
13q-	Present	129	230–227	0.4
	Absent	159	80–237	
11q-	Present	44	26–61	0.018
	Absent	159	92–226	
17p-	Present	81	1.1–160	0.4
	Absent	159	91–226	

95% CI, 95% confidence interval

**Table 5.** Multivariate Cox regression of overall survival (OS)

Variable	Hazard ratio	95%CI	P value
+12 ≥ 60% of cells	1.631	0.834–3.188	0.15
High β <sub>2</sub> microglobulin	2.259	1.070–4.770	0.03
Advanced Binet stage	1.717	1.023–2.881	0.04
High LDH	1.451	0.685–3.074	0.33
11q-	5.097	1.420–18.289	0.01

95% CI, 95% confidence interval

and expression of CD38. However, only advanced Binet stage and high β<sub>2</sub>microglobulin remained independently significant in predicting OS.

As speculated with other cytogenetic abnormalities, it may be possible that the greatest number of losses in 13q, 11q, or 17p deletions or a high percentage of cells with +12, translates genetic instability that makes the outcome of these patients worse. In our series we found that 60% of cells with +12 was the better cut-off with clinical significance, after trying different thresholds. However, further studies preferably in a prospective context need to be performed to validate this limit.

We could not find predictive value regarding other important prognostic factors such as IGHV mutation status, and expression of ZAP-70. Nevertheless, data were collected retrospectively, and these factors were not analyzed in the whole series of patients.

Coexistence of other cytogenetic abnormalities in addition to +12 was rare in our cohort, and it is consistent with previous publications [6,7,10]. Only 19% of patients presented other cytogenetic abnormalities, being 13q- the most frequent followed by 17p- and 11q-. We analyzed TTFT and OS in the different cytogenetic abnormalities, and we found a significantly shorter TTFT and OS in the group of patients with 11q-. This covariate preserved its effect in the multivariate analysis. We failed to observe these findings in the subgroup of patients with 17p-. Moreover, only a tendency to a longer OS in patients with 13q- was observed. It is noteworthy that even though 11q- was only present in 9 patients, nearly all of them presented it in ≥ 25% of 11q deleted nuclei, which has previously been associated with a worse outcome [8]. However, larger studies with more patients are needed to ascertain these findings, and address the relationship between +12 and other cytogenetic abnormalities.

## Worse prognosis in CLL patients with a high number +12 cells

To summarize, our findings suggest that the percentage of cells carrying +12 influences the outcome of these patients. We demonstrated that a high proportion of cells with +12 detected by FISH is associated with a short OS and TTFT. Our results suggest the need to consider the percentage of cells with +12 as an important prognostic factor, in future prognosis scales.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

### Acknowledgements

We thank all the physicians from the Spanish institutions who contributed clinical data. We are also grateful to Irene Rodríguez, Sara González, Teresa Prieto, M. Ángeles Ramos, Almudena Martín, Ana Díaz, Ana Simón, María del Pozo, Vanesa Gutiérrez, and Sandra Pujante from Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, for their technical assistance.

This work was partially supported by grants from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS 09/01543, PI12/00281, Proyectos de Investigación del SACYL 355/A/09, COST Action EuGESMA (BM0801), Fundación Manuel Solórzano, Obra Social Banca Cívica (Caja Burgos), Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH), and by a grant (RD12/0036/0069) from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, and European Regional Development Fund (ERDF) "Una manera de hacer Europa" and IRON-II collaborative network. The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme [FP7/2007-2013] under Grant Agreement no. 306242-NGS-PTL. María Hernández-Sánchez is fully supported by an Ayuda Predoctoral de la Junta de Castilla y León from the Fondo Social Europeo.

### References

1. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008; **371**: 1017–1029.
2. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; **46**: 219–234.
3. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; **48**: 198–206.
4. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1910–1916.
5. Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; **218**: 1403–1412.
6. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *BioMed Res Int* 2014; **2014**: 435983.
7. Rodríguez-Vicente AE, Díaz MG, Hernández-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease. *Cancer Genet* 2013; **206**: 49–62.
8. Matutes E, Oscier D, García-Marco J, et al. +12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996; **92**: 382–388.
9. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; **376**: 1164–1174.
10. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010; **24**: 2072–2079.
11. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2012; **27**: 1100–1106.
12. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with +12. *Blood* 2011; **119**: 329–331.
13. Balatti V, Lerner S, Rizzotto L, et al. +12 CLLs progress through NOTCH1 mutations. *Leukemia* 2013; **27**: 740–743.
14. Weissmann S, Roller A, Jeromin S, et al. Prognostic impact and landscape of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a study on 852 patients. *Leukemia* 2013; **12**: 2393–2396.
15. Hernández JA, Rodríguez AE, González M, et al. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica* 2009; **94**: 364–371.
16. Hernández JA, González M, Hernández JM. Chronic lymphocytic leukemia. *Med Clínica* 2010; **135**: 172–178.
17. Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; **50**: 633–643.
18. Van Dyke DL, Shanafelt TD, Call TG, et al. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2010; **148**: 544–550.
19. Marasca R, Maffei R, Martinelli S, et al. Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematol Oncol* 2013; **31**: 348–355.
20. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 2009; **114**: 957–964.
21. Harris NL, Jaffe ES, Diebold 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 Off J Am Soc Clin Oncol* 1999; **17**: 3835–3849.
22. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; **111**: 5446–5456.
23. González MB, Hernández JM, García JL, et al. The value of fluorescence in situ hybridization for the detection of 11q in multiple myeloma. *Haematologica* 2004; **89**: 1213–1218.

### Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.



# 6 ARTÍCULO 3: Characterizing patients with multiple chromosomal aberrations detected by FISH in chronic lymphocytic leukemia

I. González-Gascón y Marín, M. Hernández-Sánchez, A. E. Rodríguez-Vicente, A. Puiggros, R. Collado, E. Luño, T. González, N. Ruiz-Xivillé, M. Ortega, E. Gimeno, C. Muñoz, M. S. Infante, J. Delgado, M. T. Vargas, M. González, F. Bosch, B. Espinet, J. María Hernández-Rivas, J. Ángel Hernández. on behalf of Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC) and Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH).

Leukemia & Lymphoma 2017 Jul 21:1-10. (Epub ahead of print)

*El material suplementario al que se hace referencia en el artículo se encuentra en el Anexo B del presente documento.*





## Characterizing patients with multiple chromosomal aberrations detected by FISH in chronic lymphocytic leukemia

Isabel González-Gascón y Marín<sup>a,b\*</sup>, María Hernández-Sánchez<sup>c\*</sup>, Ana Eugenia Rodríguez-Vicente<sup>c</sup>, Anna Puiggros<sup>d,e</sup>, Rosa Collado<sup>f</sup>, Elisa Luño<sup>g</sup>, Teresa González<sup>h</sup>, Neus Ruiz-Xivillé<sup>i</sup>, Margarita Ortega<sup>j</sup>, Eva Gimeno<sup>d</sup>, Carolina Muñoz<sup>a</sup>, María Stefania Infante<sup>a</sup>, Julio Delgado<sup>k</sup>, María Teresa Vargas<sup>l</sup>, Marcos González<sup>m</sup>, Francesc Bosch<sup>j</sup>, Blanca Espinet<sup>d</sup>, Jesús María Hernández-Rivas<sup>c,m\*</sup> and José Ángel Hernández<sup>a,b\*</sup>; On behalf of Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC) and Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH)

<sup>a</sup>Hematology Department, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid, Spain; <sup>b</sup>Medicine Department, Universidad Complutense de Madrid, Spain; <sup>c</sup>Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC, Universidad de Salamanca (USAL-CSIC), Salamanca, Spain; <sup>d</sup>Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Servei DHematologia Clínica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; <sup>e</sup>Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques, Programa de Recerca en Càncer, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain; <sup>f</sup>Hematology Department, Consorcio Hospital General Universitario, Valencia, Spain; <sup>g</sup>Hematology Department, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; <sup>h</sup>Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Spain; <sup>i</sup>Laboratori Hematologia, ICO-Hospital Germans Trias i Pujol, Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC), Spain; <sup>j</sup>Hematology and Cytogenetics Departments, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; <sup>k</sup>Hematology Department, Hospital Clinic and Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; <sup>l</sup>Hematology Department, Hospital Universitario Virgen de la Macarena, Sevilla, Spain; <sup>m</sup>Hematology Department, IBSAL-Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

### ABSTRACT

We analyzed the features of chronic lymphocytic leukemia (CLL) with multiple abnormalities (MA) detected by FISH. A local database including 2095 CLL cases was used and 323 with MA (15.4%) were selected. MA was defined by the presence of two or more alterations (deletions of 13q14 (13q-), 11q22 (11q-), 17p13 (17p-) or trisomy 12 (+12)). The combination of 13q- with 11q- and 13q- with 17p-, accounted for 58.2% of the series, in contrast to 11q- with 17p- (3.7%). Patients carrying MA since diagnosis presented a short time to first therapy (TTFT) (27 months) and overall survival (OS) (76 months). The combinations including 17p- had a shorter OS (58 months) than the ones without 17p- (not reached,  $p = .002$ ). Patients with a complex-FISH were the ones with worse OS (34 months). MA imply poor prognosis when they emerge at diagnosis, probably due to the high incidence of bad prognosis markers, which may be a reflection of a more complex karyotype.

### ARTICLE HISTORY

Received 4 February 2017  
Revised 20 June 2017  
Accepted 25 June 2017

### KEYWORDS

Chronic lymphocytic leukemia; multiple abnormalities; prognosis; fluorescence *in-situ* hybridization


### Introduction

Fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) is now considered as one of the most important prognostic marker for chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients, along with Rai and Binet staging systems [1,2] and the mutational status of immunoglobulin heavy chain variable (*IGHV*) genes [3]. The generalized use of FISH is not only due to its ability to detect genetic abnormalities in around 80% of the cases, but also for its capacity to classify patients according to their prognosis. German pioneering study outlined the hierarchy of genetic changes detected by FISH that predicts disease

progression and survival in CLL, being patients with 13q deletion (13q-) as a sole abnormality those with a better outcome, followed by patients with normal karyotype, trisomy 12 (+12), 11q deletion (11q-), and 17p deletion (17p-) [4]. These findings have been validated subsequently in several studies, along with the increase in the risk associated with each abnormality when it is detected in high percentages of nuclei by FISH [5–8], including a recent report with a large cohort of 1048 cases [9]. In addition, patients with 17p- and/or *TP53* mutations, entail the unique subgroup of patients that require a different frontline treatment approach [10].

**CONTACT** José-Ángel Hernández ✉ jahernandez@salud.madrid.org 📞 Servicio de Hematología, Hospital Universitario Infanta Leonor, C/Gran Vía del Este 80, 28031 Madrid, Spain

\*These authors contributed equally to the paper.

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

A great effort has been done to decipher genomic complexity of CLL by using new generation techniques with the result of a detailed view of the mutational landscape of CLL and its vast heterogeneity [11,12–14]. In this line, genetic alterations such as 13q- and trisomy 12 have been considered early genetic events providing clonal advantage to CLL cells, whereas *TP53* aberrations could be mainly accounted as later events [15]. However, some questions remain unsolved concerning more traditional techniques such as FISH. Thus, classic deletions and trisomy 12 may also occur in combination with each other in 15–20% of the cases. However, scarce information with inconclusive results is available [4,16–18]. In fact, while Döhner's prognostic hierarchy separated cases with 13q- as a sole abnormality, the remaining categories could include cases with multiple abnormalities (MA) [4]. Moreover, complex karyotypes (CK) defined as the presence of three or more abnormalities detected by cytogenetic studies, have been reported in around 10% of the CLLs and have been associated with a dismal clinical outcome, indicating the importance in assessing the presence of genetic complexity [19–25].

Therefore, we conducted a retrospective study of cases with two or more abnormalities detected by FISH from a multicenter database containing data from 2095 patients. We selected 290 cases with more than one alteration, in order to address the following questions: 1. Which are the frequency, clinical features and outcome of patients with CLL entailing MA globally and for each particular combination? 2. Which could be the predominant clones in CLL patients with double alterations and therefore could be considered as driver genetic alterations?

### Methods

#### Patients

A total of 2095 CLL patients with a complete FISH panel were selected from the electronic database of the Spanish Groups of Cytogenetics (GCECGH) and CLL (GELLC). This database contains clinical and genetic information from 25 different Spanish institutions. FISH abnormalities taken into account were 13q-, 11q-, 17p- and +12. We focused on the 323 patients with two or more cytogenetic abnormalities detected by FISH, but the study was limited to the 290 patients with complete follow-up data. For the analysis we separated cases showing MA at diagnosis from those who acquired MA during disease evolution. The control group used for survival analysis included the 1501 patients from the same database without MA,

complete follow-up data and FISH studies performed within the first four years after diagnosis. This study was performed in accordance with national and international guidelines (Professional Code of Conduct, Declaration of Helsinki) and approved by the local ethics committees. All cases met the diagnostic criteria for CLL according to the International Workshop on CLL (IWCLL) [26]. Clinical and analytical parameters recorded at the moment of diagnosis included: date of diagnosis, age, gender, physical examination, Binet and Rai stage, absolute blood white cell count, absolute lymphocyte count, serum beta-2 microglobulin ( $\beta$ 2M) and serum lactate dehydrogenase (LDH) levels. Lymphadenopathy was defined by the presence of at least three enlarged lymph node sites. Prognostic markers such as CD38 and ZAP70 expression and *IGHV* somatic mutation status were recorded when available. Other data collected from the database were treatment, status and last follow up.

#### FISH analyses

Interphase FISH studies were performed at the time of routine clinical practice either in peripheral blood and/or bone marrow samples using commercially available probes for the following regions: 13q14, 12q13, 11q22/ATM and 17p13/P53 (Vysis/Abbott Co, Downers Grove, IL, USA). All centers used standardized FISH panels as described before [25]. Signal screening was carried out in at least 200 cells with well-delineated fluorescent spots. The sensitivity limit for the detection of +12 and deletions were  $>5$  and  $>10\%$  interphase cells with three signals and one signal, respectively, according to the cutoff of our laboratories. A complex-FISH result was considered when three or more abnormalities were observed. Moreover, mosaicism, meaning the presence of two different clones in the same patient, was assessed by the percentage of cells with each abnormality in FISH studies. Cases with two different clones were considered when a difference of at least 10% between each alteration was observed and therefore, the major clone was the one with a higher percentage of cells [16].

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 21.0 software package (SPSS, Chicago, IL). The Mann–Whitney and Fisher's exact tests were performed for quantitative and categorical variables, respectively. Overall survival (OS) and time to first therapy (TTFT) were estimated by the Kaplan–Meier method. The log-rank test was used to calculate *p* values. OS was calculated

**Table 1.** Clinical and biological characteristics at diagnosis of the whole series of 290 CLL patients with multiple abnormalities (MA) detected by FISH and according to the time of onset of these alterations: diagnosis or disease evolution.

Characteristic	Global series	%	MA at diagnosis %	MA during disease evolution %	<i>p</i> value
Age, years. Median (range)	66 (28–97)	–	71 (28–97)	60 (34–80)	.001
Sex					
Male	203	70	71	69	.4
Female	87	30	29	31	
White blood cells, (range) × 10 <sup>9</sup> /L	20.3 (5.7–370)		20.1 (6.0–341)	20.2 (5.7–370)	.9
Lymphocytes, (range) × 10 <sup>9</sup> /L	14.9 (5–355)		14.8 (5.1–329)	15.2 (5–355)	.9
LDH ( <i>n</i> = 251)					
Normal	180	72	70.6	73.9	.3
High	71	28	29.4	26.1	–
β2microglobulin ( <i>n</i> = 241)					
Normal	163	67.6	63.4	75	.04
High	78	32.4	36.6	25	–
Binet stage ( <i>n</i> = 281)					
A	197	70.1	66.3	76.7	.008
B	66	23.5	24.2	22.3	–
C	18	6.4	9.6	1	–
Lymphadenopathy ( <i>n</i> = 258)					
≤3 areas	178	69	64.6	76.3	.01
>3 areas	80	31	35.4	23.7	–
Splenomegaly ( <i>n</i> = 281)					
Yes	60	21.4	24.2	16.5	.08
No	221	78.6	75.8	83.5	–
Hepatomegaly ( <i>n</i> = 283)					
Yes	19	6.7	8.9	2.9	.05
No	264	93.3	91.1	97.1	–
B Symptoms ( <i>n</i> = 279)					
Yes	37	13.3	85.9	88.2	.3
No	242	86.7	14.1	11.8	–
IGHV mutation status ( <i>n</i> = 56)					
Mutated	15	26.8	25.8	30.8	.7
Unmutated	41	73.2	74.2	69.2	–
CD38 ( <i>n</i> = 214)					
Positive	79	36.9	32.8	34.6	.3
Negative	135	63.1	61.8	65.4	–
ZAP-70 ( <i>n</i> = 124)					
Positive	51	41.1	37.3	46.9	.3
Negative	73	58.9	62.7	53.1	–
Therapy during follow-up					
Yes	197	67.9	58.7	84	.001
No	93	32.1	41.3	16	–
Died during follow-up					
Yes	90	31	28.8	34.9	.2
No	200	69	71.2	65.1	–
17p-					
Yes	134	46.2	56.5	50.9	.1
No	156	53.8	43.5	49.1	–

from the time of diagnosis to death or last follow-up visit. TTFT was calculated as the interval between diagnosis and the start of first line treatment or last follow-up. Survival analyses were restricted to the group of patients in which MA occurred at the moment of diagnosis. Statistical significance was defined as  $p < .05$ .

## Results

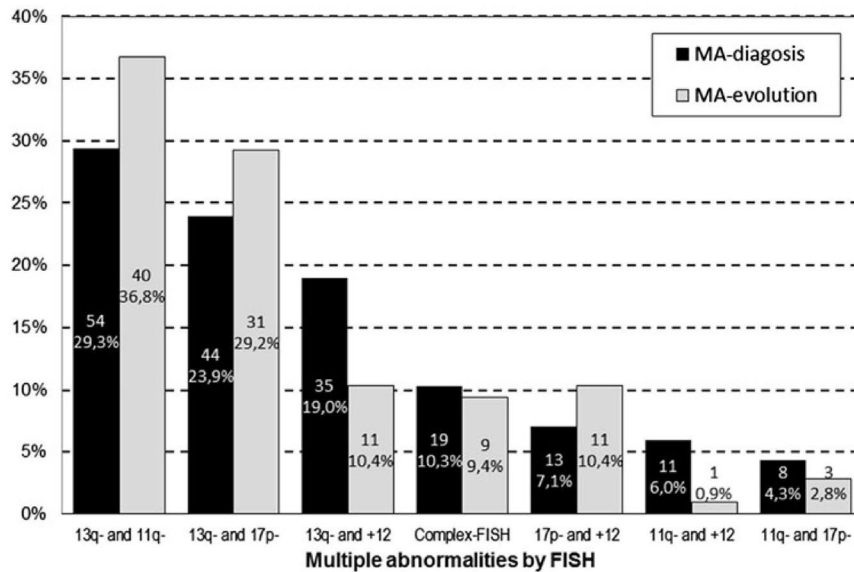
### Patient characteristics

A total of 323 cases out of 2095 CLL patients (15.4%) showed multiple abnormalities (MA) detected by FISH. However, this study was limited to the 290 cases with MA and complete follow up data. While MA emerged at diagnosis in the majority of the cases (184, 63%),

the remaining 106 (37%) showed MA in the disease evolution. Of note, 48 of the latter (45%) had received treatment for CLL prior to MA detection. The other 58 patients with MA during disease evolution were not as a consequence of treatments. The median lines of treatment received before MA acquisition was 2 (1–6). First line treatments included: chlorambucil based regimens ( $n = 23$ ); fludarabine based regimens ( $n = 18$ ); bendamustine based regimens ( $n = 3$ ); R-CHOP ( $n = 2$ ); pentostatin-cyclophosphamide-rituximab ( $n = 1$ ) and rituximab ( $n = 1$ ). Anti-CD20 was used in combination with chemotherapy in 11 of the 48 cases. On the other hand, 44 patients (41%) with MA acquired during evolution, had available FISH samples from diagnosis. These studies yielded the following results: 13q- ( $n = 18$ ); normal FISH ( $n = 11$ ); +12 ( $n = 9$ ); 11q- ( $n = 4$ );

## 6. Artículo 3: Characterizing patients with multiple chromosomal aberrations detected by FISH in chronic lymphocytic leukemia

4 I. GONZÁLEZ-GASCÓN Y MARÍN ET AL.



**Figure 1.** Distribution of abnormalities of the whole cohort of 290 patients, of the cases with MA at the moment of diagnosis and of the cases with MA during disease evolution according to FISH panel.

17p- ( $n=2$ ). Median time from diagnosis to FISH in the group of patients with MA at diagnosis was 0 days (0–118) and in the patients with MA during disease evolution of 7.6 years (0.6–19). The median age at diagnosis of the whole cohort with MA was 66 years (range 28–98 years). 203 patients of the 290 were male (70%). Most cases were presented with early Binet stages at the time of diagnosis (70.1%, stage A). Analogously, normal LDH and  $\beta 2M$  levels, absence of B symptoms, splenomegaly and hepatomegaly were observed in most cases (Table 1). Besides, cases with MA harboring 11q- had a tendency to present with more lymphadenopathy (36.1% Vs 26.1%,  $p=.05$ ). Clinical and biological characteristics of CLL patients according to the presence of MA at diagnosis or during disease evolution are also detailed in Table 1. Of note, patients with MA at diagnosis were significantly older than patients who acquired MA afterwards (71 vs. 60 years,  $p<.001$ ). When MA were detected at the moment of diagnosis, C Binet stages were more frequently observed ( $p=.008$ ),  $\beta 2M$  levels were higher ( $p=.04$ ) and more cases with lymphadenopathy were observed ( $p=.01$ ). This is not surprising, as the clinical data of the cases with MA during disease evolution where the ones from the moment of diagnosis of the disease when this cases did not harbor MA. In addition, more patients with MA acquired during evolution needed treatment ( $p=.001$ ), which is expected since FISH is usually performed before starting treatment. No other significant differences were observed between

these groups (Table 1). Interestingly, 1.7% of the cases with MA (5 of the 290) progressed as a Richter transformation. Three of them belonged to the group of patients with MA at diagnosis and harbored: +12 and 17p- ( $n=2$ ); +12 and 11q- ( $n=1$ ). The other two were cases with MA during disease evolution and had +12 and 17p- ( $n=1$ ); +12 and 13q- ( $n=1$ ).

### Distribution of abnormalities detected by FISH

The combination of cytogenetic abnormalities was heterogeneous. The most recurrent combination of two or more cytogenetic alterations in the whole series was 13q- with 11q- (32.4%, 94 cases) followed by 13q- with 17p- (25.9%, 75 cases), 13q- with +12 (15.9%, 46 cases), complex-FISH (9.6%, 28 cases), +12 with 17p- (8.3%, 24 cases), +12 and 11q- (4.1%, 12 cases) and 11q- with 17p- (3.8%, 11 cases). No significant differences in the distribution of MA were identified between those detected at diagnosis or during the disease evolution (Figure 1). Complex-FISH was observed in a low proportion of cases in both groups: 10.3% at diagnosis and 9.4% during disease evolution. Interestingly, most of them included 17p- (15/19 AT diagnosis; 8/9 during disease evolution). The less frequent combination was 11q- and 17p-, only observed in 11 cases (4.8%) in the group with MA at the moment of diagnosis and in 3 cases (2.8%) in the group with MA during disease evolution (Figure 1). Detailed results of complex-FISH are shown in supplementary material, Table S1.

**Table 2.** Mosaicism in cases with double abnormalities detected by FISH. Two different clones were considered with a difference of more than 10% of cells between each pair of abnormalities.

Pairs of double abnormalities	Number of cases
13q- and 11q-	
>10% 13q-	15
>10% 11q-	30
Same clone	40
Missing	8
13q- and 17p-	
>10% 13q-	30
>10% 17p-	6
Same clone	31
Missing	8
13q- and +12	
>10% 13q-	10
>10% +12	6
Same clone	27
Missing	3
+12 and 17p-	
>10% +12	16
>10% 17p-	3
Same clone	4
Missing	1
+12 and 11q-	
>10% +12	4
>10% 11q-	1
Same clone	3
Missing	4
11q- and 17p-	
>10% 11q-	7
>10% 17p-	1
Same clone	3
Missing	0

**Mosaicism in double abnormalities**

No relevant differences in the mosaicism levels of 13q-, +12 and/or 11q- combinations were identified in order to ascertain the acquisition pattern of these abnormalities. On the contrary, in those patients with double abnormalities involving 17p-, this deletion appeared as the minor clone in most of the cases, suggesting 13q- or +12 as earlier events whereas 17p- as a later genetic event (Table 2). Even among high-risk chromosomal alterations, 17p- was detected as the minor clone compared with 11q-.

**TTFT for patients with multiple abnormalities at diagnosis**

The TTFT was examined in the 184 patients with MA at diagnosis and was compared with the 1501 patients from the control group with complete follow up data and FISH performed within 4 years of diagnosis. The median TTFT for patients with MA at diagnosis was 27 months (CI 95%, 18–35). Figure 2(a) illustrates the TTFT according to the distribution of patients by FISH category (MA, 13q-, +12, 11q-, 17p- and patients with normal FISH). TTFT for each subset of MA is summarized in supplementary material, Table S2. It is

noteworthy that the group of patients with longer TTFT was the one including +12 and 13q-, with a median TTFT of 53 months, while CLL patients with 17p- and 11q- only had 6 months. TTFT for patients with concomitant +12 and 13q- was more similar to TTFT for patients with an isolated +12 than to TTFT for patients with an isolated 13q- (Figure 2b)).

**OS for patients with multiple abnormalities at diagnosis**

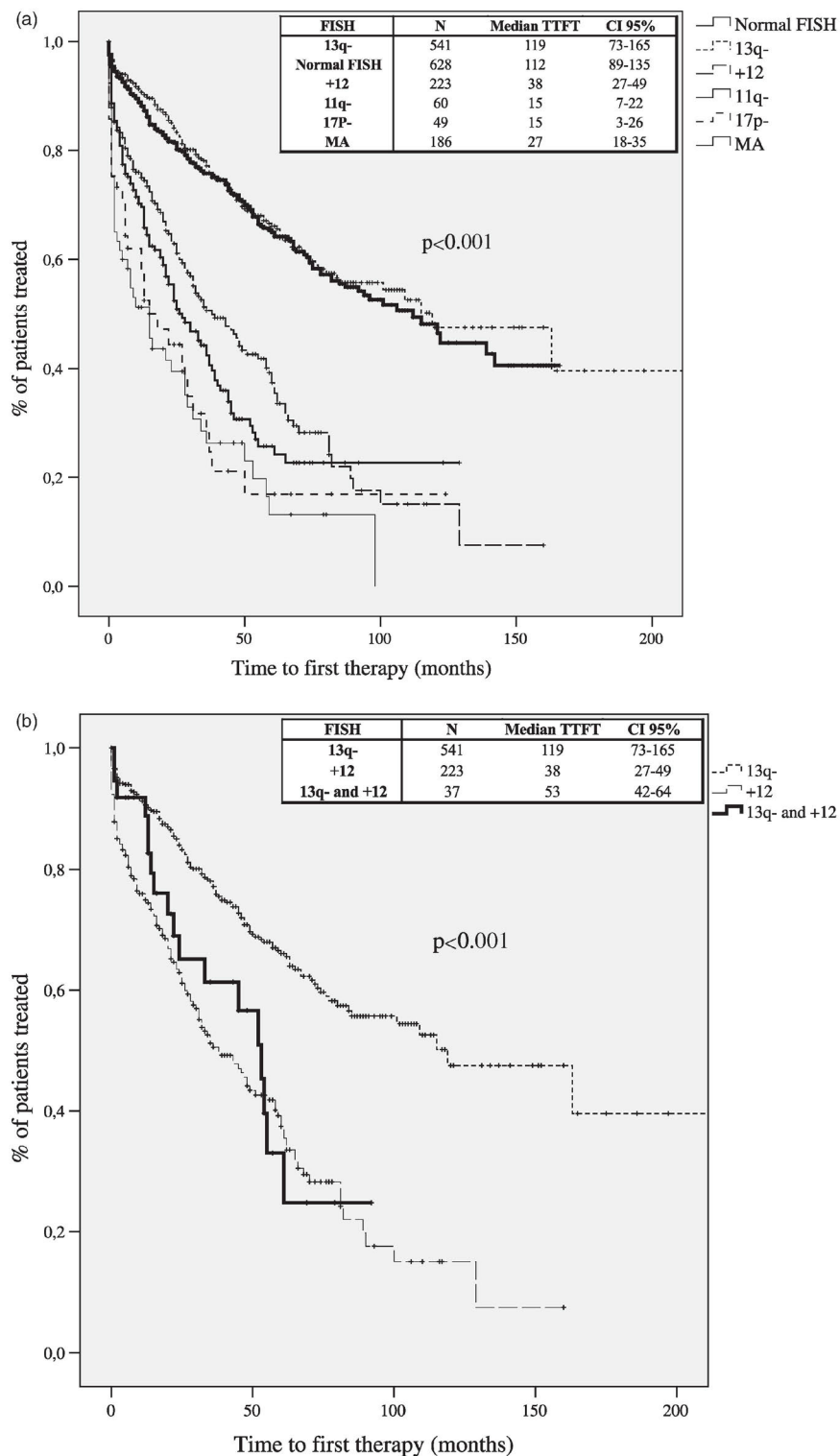
OS was also analysed in patients with MA at diagnosis and compared with the control group. The median OS for the entire group of patients with MA at diagnosis was 76 months (CI 95%, not reached) (Figure 3). Table S3 summarizes OS for each subset of MA. Within the group of patients with MA, the presence of 17p- in combination with any other alteration was associated with a shorter OS than the absence of this abnormality (not reached vs 58 months, p=.002) (Figure 4(a)). Of note, patients with complex-FISH had the shortest OS (34 months in cases with complex-FISH without 17p- and 41 months in cases with complex-FISH with 17p-) followed by patients with 17p- plus one more abnormality (58 months) and patients with only two abnormalities excluding 17p- (not reached) (p=.01) (Figure 4(b)).

**Discussion**

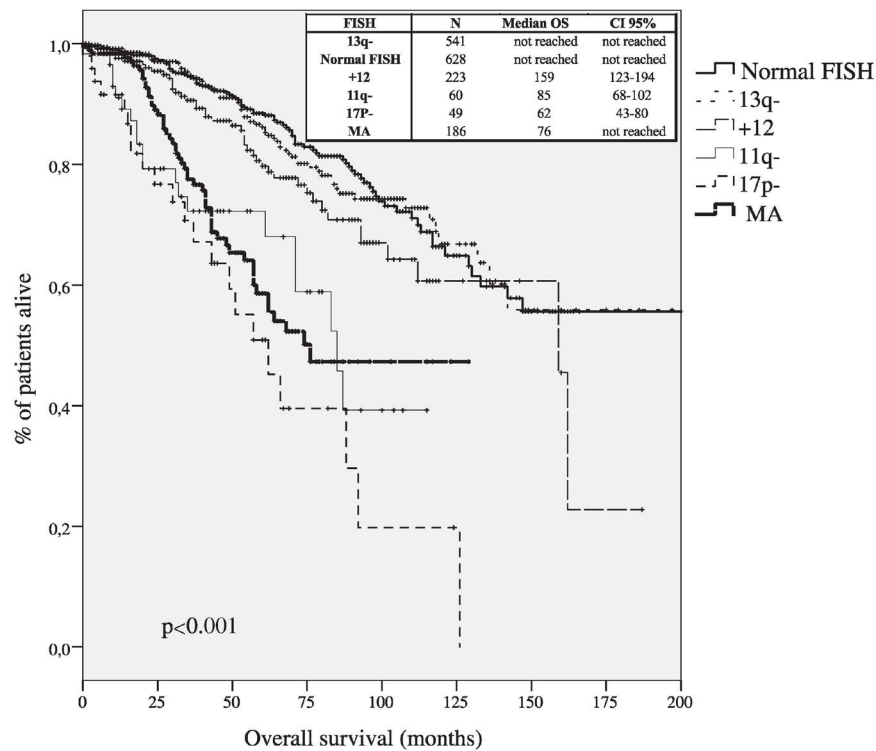
With the aim to clarify the incidence and significance of MA in CLL, we made a retrospective search for cases with MA from the electronic database of the Spanish Groups of Cytogenetics and CLL, detecting 323 cases with MA. To our knowledge, this is the largest reported cohort of CLL cases with MA. The incidence of MA altogether was 15.4%, consistent with previous studies, that reported MA in around 17% of CLL patients with the same 4-probe-FISH panel [16–18]. We observed that the distribution between MA detected by FISH was not random, with a selective association of 13q- with a high-risk FISH alteration (11q- or 17p-) (Figure 1). Both combinations accounted for 58.2% of the cases. Of note, the second most common association was 13q- with +12 (15.8%). A recent publication applying whole exome sequencing techniques found a low rate of co-occurrence between 13q- and +12, and after studying the temporal sequence of driver mutations, pointed out 13q- and +12 as two distinct points of departure on CLL pathogenesis [13,15]. We also observed a low proportion of cases with the association 13q- and +12, although in light of our results these genomic aberrations do not appear

## 6. Artículo 3: Characterizing patients with multiple chromosomal aberrations detected by FISH in chronic lymphocytic leukemia

6 I. GONZÁLEZ-GASCÓN Y MARÍN ET AL.



**Figure 2.** Time to first therapy of the 184 patients with MA and FISH performed at the moment of diagnosis. (a) Compared to the 1501 patients without MA and FISH performed within the first 4 years of diagnosis. (b) Time to first therapy for patients with concomitant +12 and 13q- versus isolated +12 and isolated 13q-.



**Figure 3.** Overall survival of the 184 cases with MA at diagnosis compared to the 1501 patients without MA and FISH performed within the first 4 years of diagnosis.

mutually exclusive. Our data confirm prior work showing 17p- and 11q- as the most uncommon combination [27].

Intra-tumor heterogeneity with different clones in the same tumor, as shown in Table 2, was present in a number of cases included in this study. The predominance of 13q- and +12 clones in contrast to 17p- clone confirmed 13q- and +12 as earlier events that could be followed by the acquisition of other secondary aberrations. In addition, we observed that in patients who acquired MA during disease evolution and had an available FISH test at the moment of diagnosis, 13q- or +12 were present in most cases (27/44) since diagnosis.

Of note, the distribution of abnormalities was similar in the group of patients with MA at diagnosis and with MA during disease evolution, as well as most of their clinical and biological characteristics. We observed a Richter evolution in 1.7% of the cases with MA, an incidence a bit lower than previously reported (2–7%) [28]; and less than what should be expected for a group of patients with dismal prognosis. Thus, in cases with MA, the incidence of Richter syndrome does not seem to be increased. However, this observation needs to be taken cautiously, as this incident

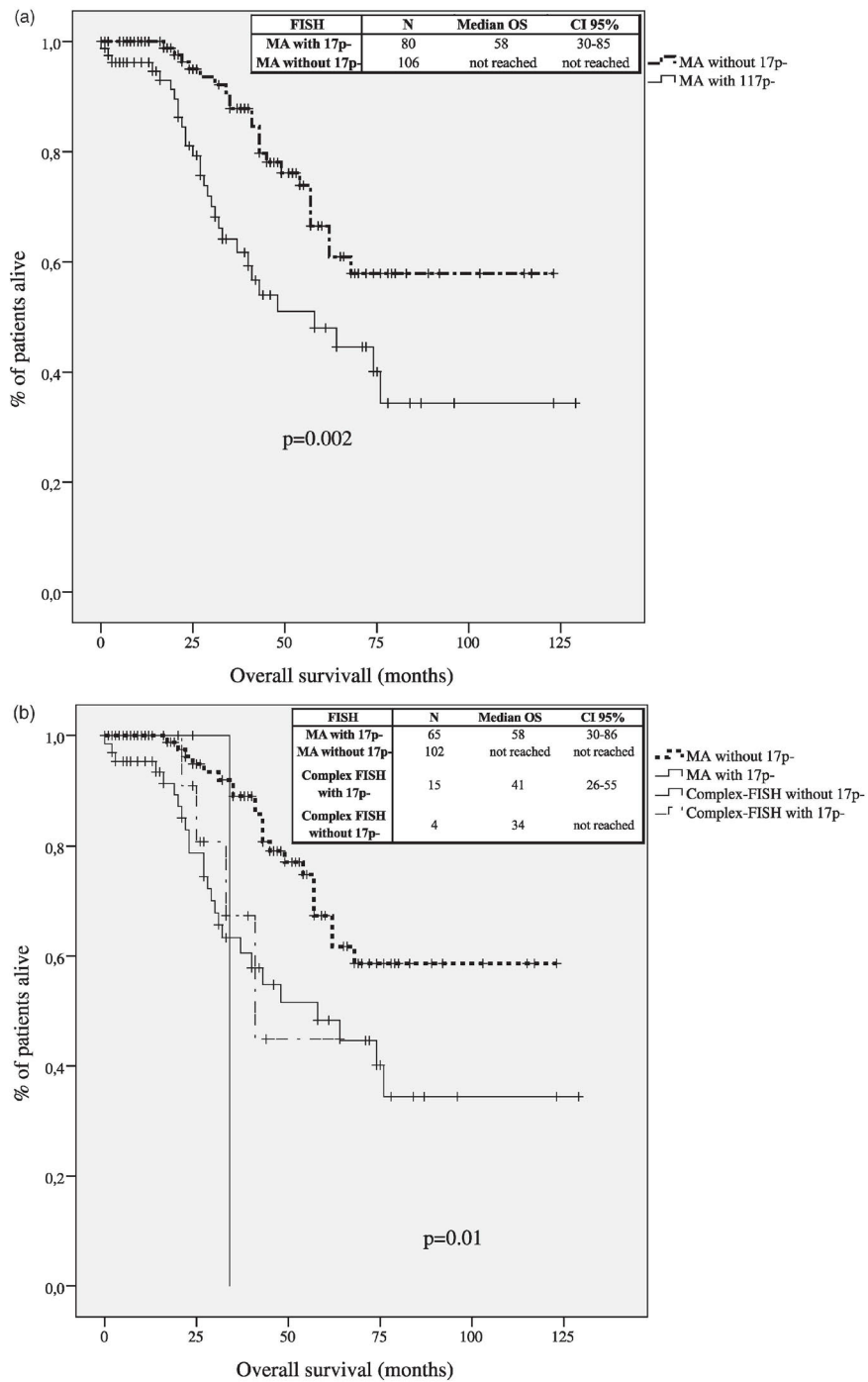
might be underestimated in our database due to its multi-centric and retrospective nature. Of note, 4/5 of the Richter syndromes harbored a high-risk abnormality (17p- or 11q-) accompanied by +12, which is in line with previous publications [28,29].

For further analysis, we separated cases depending on whether MA occurred at the moment of diagnosis or they appeared during the disease evolution. As such, 63% of cases harbored MA since diagnosis and 37% could be related to the clinical progression.

We performed OS and TTFT analysis only in the cohort of patients with MA at the moment of diagnosis, in order to avoid the effect of treatments and clonal evolution on outcomes and we compared these results with a control group that included patients with normal FISH, 13q-+12, 11q- and 17p-. Our results showed a short TTFT (27 months) and OS (76 months) for the entire cohort of patients with MA, including all subsets of double alterations and complex-FISH. These results suggest that MA in CLL entail a group of patients with poor outcome, since OS and TTFT were more similar to high-risk patients than to the rest of the cohort: 11q- (OS, 85 months; TTFT, 15 months), 17p- (OS 62 months; TTFT 15 months). However, given that the presence of 11q-, 17p- and complex-FISH

## 6. Artículo 3: Characterizing patients with multiple chromosomal aberrations detected by FISH in chronic lymphocytic leukemia

8 I. GONZÁLEZ-GASCÓN Y MARÍN ET AL.



**Figure 4.** Overall survival for patients with MA at diagnosis. (a) In cases with and without 17p-. (b) In patients with complex-FISH with 17p-, complex-FISH without 17p-, 17p- plus any other abnormality and the combination of two abnormalities excluding 17p-.

comprised 84.1% of the cases analysed (Figure 1), these findings are not surprising.

Prior studies suggested that the coexistence of +12 and 13q- aggravates the prognosis of patients carrying 13q- as a sole abnormality [30,31]. In line with this, we observed that TTFT for patients with this combination was more similar to TTFT of patients with +12 and significantly shorter than for cases with 13q- as unique abnormality [ ( $p < .001$ ), Figure 2(b)].

The co-occurrence of 11q- and 17p- has been noted as a very poor prognostic feature, even worse than either 17p- or 11q- [27]. In our study only 11 patients had this double abnormality, and showed a poor outcome, with the shortest TTFT (6 months).

Finally, we tried to elucidate the outcome distinction between 17p- and a complex-FISH, as conflicting results have been published, albeit CK and 17p- have been related separately and consistently with a negative clinical impact in CLL. We observed that patients with a complex-FISH had the shortest OS followed by 17p- plus another abnormality and two abnormalities excluding 17p- (Figure 4). Similar results have been reported recently in several series [20,32].

One of the most important limitations of FISH-testing is its inability to cover all chromosome regions and therefore some cases with complex karyotype could have been ignored in this study. However, karyotyping is not a mandatory test to perform in CLL patients according to current clinical guidelines [33] and therefore this information was only available in a limited number of patients from our database. Future work including this information is desirable. Further limitations include a bias towards treatment in the cases with MA during evolution, as treatment is one of the indications to request FISH testing, and the absence of *IGHV* mutation status information in most cases.

In conclusion, we report herein the largest cohort of CLL patients harboring MA detected by FISH. We confirmed a significant frequency of MA in CLL. Double alterations are not randomly distributed, being the association of 13q- with 11q- and with 17p- the most frequent abnormalities, while 11q- with 17p- is the least common combination. Overall, MA entail poor prognosis when emerge at diagnosis, probably due to the high incidence of bad prognosis aberrations such as 17p- and 11q- and a complex-FISH which may be a reflection or a more complex karyotype.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from the Asociación Madrileña de Hematología y Hemoterapia (convocatoria de

ayudas de impulso a la investigación en hematología y hemoterapia amhh. convocatoria 2017), the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS 09/01543, PI12/00281, PI15/01471, PI15/00437, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), European Regional Development Fund (ERDF) “Una manera de hacer Europa”, Proyectos de Investigación del SACYL 355/A/09, GRS/1172/A15, COST Action EuGESMA (BM0801), Fundación Manuel Solórzano, Obra Social Banca Cívica (Caja Burgos), Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH), by grants (RD12/0036/0069 and RD12/0036/0044) from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and European Regional Development Fund (ERDF) “Una manera de hacer Europa” (CEI 2010-1-0010), the IRON-II collaborative network and 2014/SGR585 from Generalitat de Catalunya. The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme [FP7/2007-2013] under Grant Agreement n°306242-NGS-PTL. María Hernández-Sánchez is fully supported by an Ayuda Predoctoral de la Junta de Castilla y León from the Fondo Social Europeo (JCYL-EDU/346/2013 Ph.D. scholarship). Ana Eugenia Rodríguez-Vicente is supported by a grant from Fundación Ramón Areces. We are grateful to Irene Rodríguez, Sara González, Teresa Prieto, María Ángeles Ramos, Almudena Martín, Ana Díaz, Ana Simón, María del Pozo, Vanesa Gutiérrez and Sandra Pujante from Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, for their technical assistance.

**Potential conflict of interest:** Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article online at <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1349901>.

### References

- [1] Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46: 219–234.
- [2] Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48:198–206.
- [3] Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1848–1854.
- [4] Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910–1916.
- [5] González-Gascón Y, Marín I, Hernández-Sánchez M, et al. A high proportion of cells carrying trisomy 12 is associated with a worse outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol*. 2016; 34:84–92.
- [6] Hernández JA, Rodríguez AE, González M, et al. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica*. 2009;94:364–371.

## 6. Artículo 3: Characterizing patients with multiple chromosomal aberrations detected by FISH in chronic lymphocytic leukemia

10  I. GONZÁLEZ-GASCÓN Y MARÍN ET AL.

- [7] Hernández JÁ, Hernández-Sánchez M, Rodríguez-Vicente AE, et al. A low frequency of losses in 11q chromosome is associated with better outcome and lower rate of genomic mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *PLoS ONE*. 2015;10: e0143073.
- [8] Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood*. 2009;114:957–964.
- [9] Van Dyke DL, Werner L, Rassenti LZ, et al. The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol*. 2016;177:105–113.
- [10] Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26: 78–v84.
- [11] Roos-Weil D, Nguyen-Khac F, Bernard OA. Chronic lymphocytic leukemia: time to go past genomics?. *Am J Hematol*. 2016;91:518–528.
- [12] Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015;526:519–524.
- [13] Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526:525–530.
- [14] Guièze R, Wu CJ. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;126:445–453.
- [15] Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013;152:714–726.
- [16] Reddy KS. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol*. 2006;132:705–722.
- [17] Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*. 2007;21:2442–2451.
- [18] Sindelárová L, Michalová K, Zemanová Z, 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.
- [19] Rigolin GM, del Giudice I, Formigaro L, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic correlations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54:818–826.
- [20] Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*. 2014;89:249–255.
- [21] Jaglowski SM, Ruppert AS, Heerema NA, et al. Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012;159:82–87.
- [22] Travella A, Ripollés L, Aventin A, et al. Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *Cytogenetic and FISH analysis*. *Hematol Oncol*. 2013;31:79–87.
- [23] Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, et al. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*. 2015;121:3612–3621.
- [24] Dubuc AM, Davids MS, Pulluqi M, et al. FISHing in the dark: how the combination of FISH and conventional karyotyping improves the diagnostic yield in CpG-stimulated Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Am J Hematol*. 2016;91:978–983.
- [25] Heerema NA, Byrd JC, Dal Cin PS, et al. Stimulation of chronic lymphocytic leukemia cells with CpG oligodeoxynucleotide gives consistent karyotypic results among laboratories: a CLL Research Consortium (CRC) Study. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;203:134–140.
- [26] Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the international workshop on chronic lymphocytic leukemia updating the national cancer institute-working group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111:5446–5456.
- [27] Greipp PT, Smoley SA, Viswanatha DS, et al. Patients with chronic lymphocytic leukaemia and clonal deletion of both 17p13.1 and 11q22.3 have a very poor prognosis. *Br J Haematol*. 2013;163:326–333.
- [28] Parikh SA, Rabe KG, Call TG, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort study of newly diagnosed patients. *Br J Haematol*. 2013;162:774–782.
- [29] Strati P, Abruzzo LV, Wierda WG, et al. Second cancers and richter transformation are the leading causes of death in patients with trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15: 420–427.
- [30] Davids MS, Vartanov A, Werner L, et al. Controversial fluorescence in situ hybridization cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia: new insights from a large cohort. *Br J Haematol*. 2015;170: 694–703.
- [31] Chena C, Avalos JS, Bezares RF, et al. Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. *Eur J Haematol*. 2008;81:94–99.
- [32] Herling CD, Klaumünzer M, Rocha CK, et al. Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood*. 2016; 128:395–404.
- [33] Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. 2013;88:803–816.

# 7 ARTÍCULO 4: Hyperdiploidy as a rare event that accompanies poor prognosis markers in CLL

I. González-Gascón y Marín, A. Á. Martín, M. Hernández-Sánchez, C. Robledo, M. L. Hermosín, N. de las Heras, L. Lacalle, J. Galende, F. de Arriba, A. E. Rodríguez-Vicente, J.-Á. Hernández, J. M. Hernández-Rivas

European Journal of Haematology, Volume 98, Issue 2, Pages 142–148, February 2017.

*El material suplementario al que se hace referencia en el artículo se encuentra en el Anexo C del presente documento.*







ORIGINAL ARTICLE

## Hyperdiploidy as a rare event that accompanies poor prognosis markers in CLL

Isabel González-Gascón y Marín<sup>1,2\*</sup>, Ana África Martín<sup>3\*</sup>, María Hernández-Sánchez<sup>4</sup>, Cristina Robledo<sup>4</sup>, María Lourdes Herminos<sup>5</sup>, Natalia de las Heras<sup>6</sup>, Laura Lacalle<sup>7</sup>, Josefina Galende<sup>8</sup>, Felipe de Arriba<sup>9</sup>, Ana Eugenia Rodríguez-Vicente<sup>4</sup>, José-Ángel Hernández<sup>1,2\*</sup>, Jesús María Hernández-Rivas<sup>3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid; <sup>2</sup>Departamento de Medicina, Universidad Complutense, Madrid; <sup>3</sup>Servicio de Hematología, IBSAL-Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca; <sup>4</sup>Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC, Universidad de Salamanca, Salamanca; <sup>5</sup>Hospital Jerez de la Frontera, Cádiz; <sup>6</sup>Hospital Virgen Blanca, León; <sup>7</sup>Hospital Miguel Servet, Zaragoza; <sup>8</sup>Hospital el Bierzo, Ponferrada, León; <sup>9</sup>Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain

### Abstract

The presence of chromosomal gains other than trisomy 12 in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is unusual. However, some patients may show gains on several chromosomes simultaneously suggesting a hyperdiploid karyotype. *Objective:* The objective of this study was to analyse by FISH the frequency and prognostic impact of hyperdiploidy in CLL. *Method:* A review of 1359 consecutive cases diagnosed with CLL referred for FISH analysis to a unique institution was carried out. Hyperdiploidy was considered when a gain of at least three of the five FISH probes used was observed. *Results:* Seven cases (0.51%) with hyperdiploidy were found, confirming that it is a rare event in this disease. Although most patients presented with early Binet stages at diagnosis, six of seven (86%) shortly progressed. The median of time to the first therapy (TTFT) and overall survival (OS) for the patients with hyperdiploidy were short (1.4 months and 20 months, respectively). Moreover, comparing them with a control group of patients (non-hyperdiploid) with completed follow-up data, TTFT and OS of the patients with hyperdiploidy were significantly shorter than the control group. *Conclusion:* The presence of hyperdiploidy is uncommon and probably associated with poor prognostic markers in CLL.

**Key words** chronic lymphocytic leukaemia; hyperdiploidy; prognosis; fluorescence *in situ* hybridisation

**Correspondence** José-Ángel Hernández, Servicio de Hematología, Hospital Universitario Infanta Leonor, C/ Gran Vía del Este 80, 28031 Madrid, Spain. Tel: 0034911918932; Fax: 0034911919086; e-mail: jahernandezr@salud.madrid.org

\*Contributed equally to the article.

Accepted for publication 19 September 2016

doi:10.1111/ejh.12812

Chromosomal abnormalities detected by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) can be observed in more than 80% of the cases diagnosed with chronic lymphocytic leukaemia (CLL), being the most frequent 13q deletions (13q-), followed by 11q deletions (11q-), trisomy 12 (+12) and 17p deletions (17p-). These alterations have become one of the most important prognostic markers of CLL, as they are able to divide patients according to a hierarchical risk model and can also be used for therapeutic decisions (1–4). Thus, 17p- entails the group of patients with the worse prognosis. Mutations of *TP53* (located on 17p13)

are detected in ~10% of patients with CLL at diagnosis (5, 6) and may or may not be accompanied by the deletion of the other allele (7). Nowadays, the presence of *TP53* abnormalities is the only biomarker that changes the treatment strategy, as these cases are usually resistant to conventional therapies (2). Trisomy 12 defines a heterogeneous group of patients with intermediate prognosis. Several factors have been identified, such as the percentage of the trisomy, or the presence of additional genetic abnormalities, to refine the outcome of these cases (8). In fact, additional trisomies to +12 have been described

before in CLL, usually involving chromosomes 19 and 18, with a specific clinical and biological profile (9).

Although CLL is a genetically stable disease with relatively few genomic abnormalities in most cases (5, 6, 10–12), about 10–20% of patients present with genomic complexity, considered in most studies as the presence of three or more abnormalities. Complex karyotypes in CLL have been steadily related to poor prognosis (13–17).

Hyperdiploidy is a well-known cytogenetic abnormality not uncommon in some haematological malignancies such as B acute lymphoblastic leukaemia (B-ALL), multiple myeloma (MM) or acute myeloid leukaemia (AML). This phenomenon is usually associated with a favourable clinical outcome in MM and childhood B-ALL (18, 19). However, very little is known about the frequency and prognostic implications of hyperdiploidy in CLL. In this study, we observe the presence of hyperdiploidy as a very infrequent cytogenetic abnormality in CLL that could be associated to a dismal prognosis.

### Patients and methods

A retrospective review of 1359 consecutive cases diagnosed with CLL referred for FISH analysis to the Salamanca University Hospital (Spain), between 2004 and 2012, was carried out. Clinical and biological data of CLL with hyperdiploidy as well as of a control group of 633 patients with CLL without chromosomal gains from the total of the analysed cohort were collected. Written informed consent was obtained from the patients before diagnostic procedures were performed.

### FISH analyses

Interphase FISH analysis was performed on peripheral blood and/or bone marrow samples at the time of diagnosis and during follow-up. For this purpose, commercially available probes for the following regions were used: 11q22/ATM, 12q13, 13q34, 14q34/IGH and 17p13/TP53 (Vysis/Abbott Co, Downers Grove, IL, USA). For patients with 14q34 rearrangement, additional FISH studies including 11q14/BCL1 and 18q21/BCL2 to rule out mantle cell and follicular lymphoma were carried out. Methods for FISH analysis are described elsewhere (20). Several studies in multiple myeloma used FISH to assess hyperdiploidy and demonstrated that hyperdiploid karyotypes were characterised by the gain of at least two chromosomes, being this approach highly specific (18, 21). As trisomy 12 is a frequent abnormality in CLL, we considered hyperdiploidy as the gain of at least three of the five FISH probes used.

### TP53 mutation status analysis

The mutational analysis by NGS was carried out in the seven patients with hyperdiploidy. Genomic DNA was

extracted and quantified using a Qubit DNA BR assay kit or HS assay kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) and tested the adequate quality (22).

Amplicon-based NGS was carried out to investigate the mutational status of *TP53* (exons 4–11) gene. The oligonucleotide design was performed as part of the IRON-II network. Information about primer sequences and the PCR conditions has been previously described elsewhere (23). The amplicon libraries were sequenced on a GS Junior platform (454 Life Sciences, a Roche company, Branford, CT, USA), according to the manufacturer's instructions by using the 454 Titanium amplicon system (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).

The median number of reads was 1328 [201–3919], allowing variants to be identified down to a detection limit of 2% (24).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 21.0 software package (SPSS, Chicago, IL, USA). The Fisher's exact and Mann–Whitney tests were performed for categorical and quantitative variables, respectively. Overall survival (OS) and time to first therapy (TTFT) were estimated by the Kaplan–Meier method. OS was calculated from the time of diagnosis and from the time of hyperdiploidy to death or last follow-up visit. TTFT was calculated as the interval between diagnosis and the start of first line treatment. Univariate survival analysis was carried out with the log-rank test and multivariate analysis with the Cox regression model. Statistical significance was defined as  $P < 0.05$ .

### Results

#### Patient characteristics

Seven cases with hyperdiploidy were identified out of the 1359 patients with CLL (0.51%), referred for evaluation by FISH. Five cases (cases n° 3–7) presented hyperdiploidy at diagnosis; the other two (case n° 1 and 2) during disease evolution and after having received treatment with chlorambucil. Patient characteristics are summarised in Table 1. Four patients (57%) were female, and the median age at diagnosis was 74 years old (range 63–86). The median white blood cell count at the time of diagnosis was  $16 \times 10^9/L$  (range, 7–67). No significant anaemia or thrombocytopenia was detected in any case at diagnosis. It is noteworthy that the immunophenotype of three of the seven cases suggested the diagnosis of atypical CLL. Serum LDH and  $\beta 2$  microglobulin levels at diagnosis were high in 57% (4/7) and 29% of the cases (2/7), respectively. Three of seven (43%) patients presented with splenomegaly and hepatomegaly and 29% (2/7) with more than three enlarged lymph node regions. The presence of B symptoms was detected in 29% (2/7) of the cases. Of note, at the time of diagnosis, most cases were

classified as early stages according to Binet classification (stage A 57% (four cases); stage B 29% (two cases); stage C 14% (one case)). *IGHV* mutation status was available in four of the seven cases being all of them classified as unmutated pattern.

In comparison with the patients with non-hyperdiploid CLL (control group), cases with hyperdiploidy showed lower levels of haemoglobin ( $P = 0.03$ ), higher levels of LDH ( $P = 0.01$ ), more advanced Rai stage ( $P = 0.01$ ) and more hepatomegaly ( $P = 0.01$ ). Although not statistically significant, a trend in older age and unmutated *IGHV* pattern was also observed in cases with hyperdiploidy (Table 1).

### FISH findings

Besides hyperdiploidy, additional chromosomal abnormalities were detected in four (57%) of the patients including: 17p- (two cases), 11q- and *IGH* alteration (one case), and 13q- and

*IGH* deletion (one case). Detailed FISH results are shown in Table 2. In addition, a higher percentage of cases with 17p- was observed in the hyperdiploid group of patients than in the non-hyperdiploid group ( $P = 0.04$ ), without statistically differences among the other recurrent CLL cytogenetic alterations (Table 3). We excluded cases with trisomy 12, as it is observed in all cases with hyperdiploidy.

### *TP53* mutational status

Only one patient (case n° 7) showed a missense *TP53* mutation (c.613T>G; p.Y205D) with a mutational burden of 95%. This variation was previously described as a mutation in the COSMIC database (COSM43844). This *TP53* mutated case did not show 17p- deletion.

### Time to first therapy

Six of the seven patients with hyperdiploidy (86%) required treatment during follow-up. Interestingly, a significantly

**Table 1** Clinical and biological characteristics of patients with hyperdiploidy and the comparative analysis with patients with non-hyperdiploid CLL (control group)

	Cases with hyperdiploidy (N = 7)	Control group (N = 633)	P
Age, years			
Median (range)	74 (63–86)	67 (25–100)	0.06
Sex			
Male/Female N (%)	3 (40)/4 (60)	412 (65)/221 (35)	0.2
White blood cell count ( $\times 10^9/L$ )			
Median (range)	16 (7–67)	18 (5–96)	0.4
Haemoglobin (g/dL)			
Median (range)	12.6 (10.5–14.8)	14.2 (4–19)	0.03
Platelet count ( $\times 10^9/L$ )			
Median (range)	181 (141–237)	185 (113–587)	0.6
High LDH level N (%)	4 (57)	88 (14)	0.01
High $\beta 2$ microglobulin level N (%)	2 (29)	217 (38)	0.4
Splenomegaly N (%)	3 (43)	101 (16)	0.09
Hepatomegaly N (%)	3 (43)	49 (8)	0.01
$\geq 3$ enlarged node regions N (%)	2 (29)	117 (19)	0.4
B symptoms N (%)	2 (29)	55 (9)	0.1
Binet stage N (%)			
A	4 (57)	491 (78)	0.1
B	2 (29)	98 (16)	
C	1 (14)	37 (6)	
Rai stage N (%)			
0	1 (14)	367 (60)	0.01
1	4 (57)	123 (20)	
2	0	82 (13)	
3	1 (14)	21 (3)	
4	1 (14)	23 (4)	
Mutational status N (%)			
Mutated	0 (0)	169 (53)	0.05
Unmutated	4 (100)	151 (47)	

**Table 2** Detailed fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) results for each case and results from *TP53* mutation analysis

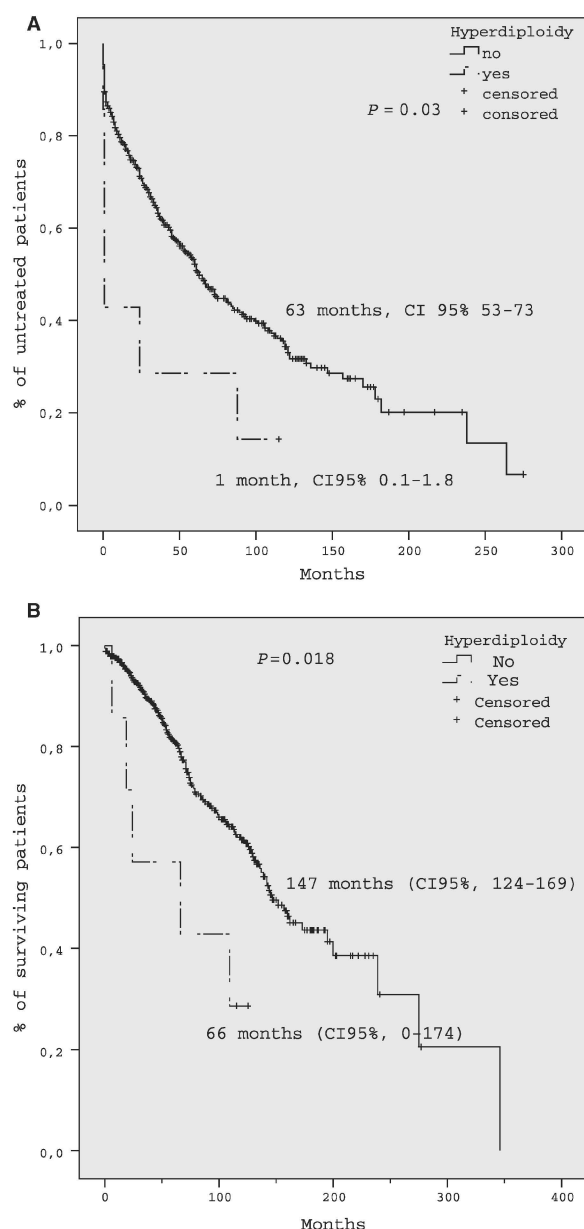
Case	Time point	Number of chromosomes with the FISH panel (% of cells with the gain)	Other FISH abnormalities (% of cells with the abnormality)	<i>TP53</i> mutational status
1	Progression	3n (23%); 4n (60%)		Non-mutated
2	Progression	3n (7%)	17p- (75%)	Non-mutated
3	Diagnosis	3n (35%)	17p- (74%)	Non-mutated
4	Diagnosis	3n (15%)		Non-mutated
5	Diagnosis	3n (22%); 4n (14%)	11q- (36%) and <i>IGH</i> rearrangement (53%)	Non-mutated
6	Diagnosis	3n (20%)	13q- (13%) and <i>IGH</i> deletion (19%)	Non-mutated
7	Diagnosis	3n (15%)		Missense mutation (95%)

**Table 3** Comparison between FISH abnormalities in the group with hyperdiploidy and the control group

FISH abnormality <sup>1</sup>	Cases with hyperdiploidy (%)	Control group (%)	P
13q-	1 (14)	283 (46)	0.09
11q-	1 (14)	76 (12)	0.6
17p-	2 (29)	30 (5)	0.04
<i>IGH</i> abnormalities	2 (29)	38 (6)	0.06

<sup>1</sup>Trisomy 12 was excluded from the comparison as in the hyperdiploidy group is universal.

shorter TTFT was observed in patients with hyperdiploidy than in patients with CLL without this phenomena (1 month CI 95%, 0.1–1.8 vs. 63 months CI 95%, 53–73;  $P = 0.03$ ) (Fig. 1A). Most treated patients with hyperdiploidy (4/6, 66%) required two or more chemotherapy therapies (median 3, range: 1–4), due to refractoriness or relapse. Median duration of response to first line treatment was 7 months (0–36) for this subgroup.



**Figure 1** Survival analysis according to Kaplan–Meier method for (A) time to first therapy in the group of patients with hyperdiploidy and the control group. (B) Overall survival from diagnosis in the group of patients with hyperdiploidy and the control group.

Other significant prognostic variables for TTFT in the univariate analysis for all the patients with clinical data ( $n = 640$ ) were as follows: high LDH levels ( $P < 0.001$ ), high  $\beta 2$  microglobulin levels ( $P < 0.001$ ), hepatomegaly ( $P < 0.001$ ), splenomegaly ( $P < 0.001$ ),  $>3$  nodal sites affected ( $P < 0.001$ ), Rai ( $P < 0.001$ ) and Binet ( $P < 0.001$ ) stages, B symptoms ( $P < 0.001$ ), mutational status ( $P < 0.001$ ) and 17p- ( $P < 0.001$ ) (Table S1A). In the multivariate analysis, mutational status ( $P = 0.001$ ), advanced Rai stage ( $P = 0.007$ ), B symptoms ( $P = 0.001$ ), hepatomegaly ( $P = 0.001$ ) and  $>3$  nodal lymph node areas affected ( $P < 0.02$ ) remained significant (Table S2A).

### Overall survival

With a median follow-up of 66 months (6–115), five patients with hyperdiploidy have died due to disease progression (three cases), infection (one case) and cardiovascular disease (one case). Median OS from the time of diagnosis in the group of patients with hyperdiploidy was significantly shorter than in the control group, being respectively 66 months (CI 95%, 0–174) and 147 months (CI 95%, 124–169) ( $P = 0.018$ ) (Fig. 1B). It is noteworthy that OS from the time of hyperdiploidy acquisition was even shorter, 20 months (CI 95%, 16–24).

In the univariate analysis for OS, the other significant prognostic variables were high LDH levels ( $P < 0.001$ ), high  $\beta 2$  microglobulin levels ( $P < 0.001$ ), hepatomegaly ( $P = 0.005$ ), splenomegaly ( $P < 0.001$ ),  $>3$  nodal sites affected ( $P < 0.001$ ), Rai ( $P < 0.001$ ) and Binet ( $P < 0.001$ ) stages, B symptoms ( $P < 0.001$ ), mutational status ( $P < 0.001$ ) and 17p- ( $P < 0.001$ ) (Table S1B). In the multivariate analysis, only high  $\beta 2$  microglobulin levels ( $P < 0.03$ ), Rai stage ( $P = 0.01$ ), 17p- ( $P < 0.001$ ) and mutational *IGHV* status ( $P = 0.002$ ) remained as significant prognostic markers (Table S2B).

### Discussion

Cytogenetic abnormalities detected by FISH have become a key prognostic factor in CLL and are widely used in clinical practice nowadays, even for treatment selection (25, 26). The most frequent abnormalities, observed in around 80% of the patients, include 13q-, +12, 11q- and 17q-. These alterations can explain the clinical heterogeneity of CLL (1). However, little is known about the incidence and meaning of other alterations less prevalent such as hyperdiploidy. To our knowledge, it has scarcely been mentioned before in two case reports, and in both associated with poor prognosis (27, 28). For this purpose, we conducted a retrospective study to find out the incidence and clinical significance of this alteration in CLL.

We confirmed that hyperdiploidy is a very rare event in CLL, as we found it in less than 1% of the large cohort of

cases analysed in our study. The incidence of hyperdiploidy in CLL has not been determined before. In this study, we present the first published cohort of CLL cases with hyperdiploidy, allowing us to characterise patients with this alteration better than in previous reports. Scarce reports on this topic suggested that when hyperdiploidy appears in CLL it entails bad prognosis, in contrast to what happens in other entities such as multiple myeloma (MM) (18). Our data are also in line with these suspicions, pointing out that hyperdiploidy could confer an aggressive clinical course to CLL, despite most of the cases were labelled as early stages according to Binet classification. We found that most patients with hyperdiploidy (86%) needed treatment with a very short TTFT (1.4 months), significantly shorter than the control group. In addition, short treatment responses (median, 7 months) and a high need for sequential lines of treatment (median, 3) were noticed. We also observed a shorter OS from the time of diagnosis (66 months), but even worse from the moment of hyperdiploidy acquisition (20 months).

We observed that hyperdiploidy appeared during disease evolution and after specific treatment for CLL in 29%. Unfortunately, due to the small proportion of cases with this abnormality, we could not assess whether the negative prognostic course of these cases was caused by hyperdiploidy or as a consequence of clonal evolution. However, most of the cases with hyperdiploidy had not any treatment for CLL before this aberration occurred.

Of note, all CLL with gains and an available mutational status analysis showed an *IGHV* unmutated status, a well-defined bad prognosis abnormality in patients with CLL. A clear association between hyperdiploidy and mutation status could not be confirmed in comparison with the control group, probably due to the scarce number of patients with hyperdiploidy. However, a trend of a significant association was observed (Table 1,  $P = 0.05$ ). In addition, other cytogenetic abnormalities were also observed in 57% of the cases, being most of them with high-risk FISH aberrations. 17p- and hyperdiploidy concurred in 29% of the cases, in a higher percentage than the control group (5%,  $P = 0.04$ , Table 3) (1, 29). *TP53* abnormalities represent strong predictors of poor survival (30, 31). Of note, *TP53* mutational screening revealed that one patient without 17p- had a *TP53* mutation in the group of patients with hyperdiploidy. Unfortunately, a *TP53* analysis could not be performed to the control group. Therefore, three of seven patients with hyperdiploidy showed *TP53* disruption. Losses in 17p and *TP53* mutations have been reported as a late genetic alteration in pathogenesis of CLL (10). Interestingly, we saw these clones appear as the predominant clone in our cases with hyperdiploidy, suggesting that they could be an earlier event than hyperdiploidy. Therefore, hyperdiploidy could be explained by the genomic instability that occurs as a consequence of *TP53* loss (32, 33). The association of hyperdiploidy with these high-risk features is consistent with the

poor clinical outcome observed in the patients included in our study. However, due to the low representation of patients with hyperdiploidy in this study, we could not exclude that the bad prognosis observed is confounded by these poor risk biomarkers. Thus, these findings need to be taken cautiously, and further studies with more cases, preferably in a prospective setting are needed.

The results of this study are limited by the absence of a conventional cytogenetic analysis along with FISH, to confirm triploid or tetraploid karyotypes. This test was not performed in our cohort of patients, as it is not generally recommended in current CLL guidelines (34). In any case, we considered hyperdiploidy in these cases due to the concurrence of the same gains in different chromosomes. Another limitation is the presence of additional alterations in four of the seven cases. However, only two cases contained two other abnormalities in addition to hyperdiploidy. Unfortunately, we could not ensure that the bad prognosis of these cases was caused by hyperdiploidy, or genomic complexity. Nevertheless, in CLL, it is unclear whether numerical aberrations should be counted as an unfavourable prognostic marker in complex karyotypes (9). Additional studies are needed including karyotypes, preferably with new techniques, to clarify these findings.

In the light of our results, we can sum up that hyperdiploidy in CLL is a rare event. CLL patients with this abnormality frequently display negative prognostic factors such as *TP53* disruption suggesting that hyperdiploidy may confer poor prognosis.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS 09/01543, PI12/00281 and PI15/01471, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), European Regional Development Fund (ERDF) 'Una manera de hacer Europa', Proyectos de Investigación del SACYL 355/A/09, GRS/1172/A15, COST Action EuGESMA (BM0801), Fundación Manuel Solórzano, Obra Social Banca Cívica (Caja Burgos), Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH), by grants (RD12/0036/0069 and RD12/0036/0044) from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and European Regional Development Fund (ERDF) 'Una manera de hacer Europa' (CEI 2010-1-0010) and the IRON-II collaborative network. The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme [FP7/2007-2013] under grant agreement n°306242-NGS-PTL. María Hernández-Sánchez is fully supported by an Ayuda Predoctoral de la Junta de Castilla y León from the Fondo Social Europeo (JCYL-EDU/346/2013 Ph.D. scholarship). Ana Eugenia Rodríguez-Vicente is supported by a grant from Fundación Ramón Areces. We are

grateful to Irene Rodríguez, Sara González, Teresa Prieto, María Ángeles Ramos, Almudena Martín, Ana Díaz, Ana Simón, María del Pozo, Vanesa Gutiérrez and Sandra Pujante from Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, for their technical assistance.

### Conflict of interests

The authors declare no competing interests regarding the publication of this article.

### References

1. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;**343**:1910–6.
2. Dreger P, Schetelig J, Andersen N, Corradini P, van Gelder M, Gribben J, *et al.* Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood* 2014;**124**:3841–9.
3. Rodríguez-Vicente AE, Díaz MG, Hernández-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease. *Cancer Genet* 2013;**206**:49–62.
4. Hernández JA, Rodríguez AE, González M, Benito R, Fontanillo C, Sandoval V, *et al.* A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica* 2009;**94**:364–71.
5. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;**475**:101–5.
6. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JL, *et al.* Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2015;**526**:519–24.
7. Maleikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, *et al.* Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 2009;**114**:5307–14.
8. González-Gascón Y, Marín I, Hernández-Sánchez M, Rodríguez-Vicente A-E, Sanzo C, Aventín A, Puiggros A, *et al.* A high proportion of cells carrying trisomy 12 is associated with a worse outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol* 2016;**34**:84–92.
9. Baliakas P, Puiggros A, Kochelli A, Sutton L-A, Nguyen-Khac F, Gardiner A, *et al.* Additional trisomies amongst patients with chronic lymphocytic leukemia carrying trisomy 12: the accompanying chromosome makes a difference. *Haematologica* 2016; **101**:e299–e302.
10. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, *et al.* Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013;**152**:714–26.
11. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, *et al.* Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015;**526**:525–30.
12. Rigolin GM, del Giudice I, Formigaro L, Saccenti E, Martinielli S, Cavallari M, *et al.* Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic correlations. *Genes Chromosom Cancer* 2015;**54**:818–26.
13. Jaglowski SM, Ruppert AS, Heerema NA, Bingman A, Flynn JM, Grever MR, *et al.* Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2012;**159**:82–7.
14. Woyach JA, Lozanski G, Ruppert AS, Lozanski A, Blum KA, Jones JA, *et al.* Outcome of patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia treated with flavopiridol: impact of genetic features. *Leukemia* 2012;**26**:1442–4.
15. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, *et al.* Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol* 2014;**89**:249–55.
16. Travella A, Ripollés L, Aventin A, Rodríguez A, Bezares RF, Caballín MR, *et al.* Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia. Cytogenetic and FISH analysis. *Hematol Oncol* 2013;**31**:79–87.
17. Herling CD, Klaumünzer M, Rocha CK, Altmüller J, Thiele H, Bahlo J, *et al.* Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood* 2016;**128**:395–404.
18. Wuilleme S, Robillard N, Lodé L, Magrangeas F, Beris H, Harousseau J-L, *et al.* Ploidy, as detected by fluorescence in situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia* 2005;**19**:275–8.
19. Moorman AV, Harrison CJ, Buck GAN, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, *et al.* Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood* 2007;**109**:3189–97.
20. González MB, Hernández JM, García JL, Lumbrecas E, Castellanos M, Hernández JM, *et al.* The value of fluorescence in situ hybridization for the detection of 11q in multiple myeloma. *Haematologica* 2004;**89**:1213–8.
21. Chng WJ, Van Wier SA, Ahmann GJ, Winkler JM, Jalal SM, Bergsagel PL, *et al.* A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and nonhyperdiploid dichotomy in MGUS. *Blood* 2005;**106**:2156–61.
22. Forero-Castro M, Robledo C, Lumbrecas E, Benito R, Hernández-Sánchez JM, Hernández-Sánchez M, *et al.* The presence of genomic imbalances is associated with poor outcome in patients with burkitt lymphoma treated with dose-intensive chemotherapy including rituximab. *Br J Haematol* 2016;**172**:428–38.

23. Hernández JÁ, Hernández-Sánchez M, Rodríguez-Vicente AE, Grossmann V, Collado R, Heras C, *et al.* A low frequency of losses in 11q chromosome is associated with better outcome and lower rate of genomic mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *PLoS ONE* 2015;**10**:e0143073.
24. Grossmann V, Roller A, Klein H-U, Weissmann S, Kern W, Haferlach C, *et al.* Robustness of amplicon deep sequencing underlines its utility in clinical applications. *J Mol Diagn* 2013;**15**:473–84.
25. Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013;**2013**:138–50.
26. Shindiapina P, Brown JR, Danilov AV. A new hope: novel therapeutic approaches to treatment of chronic lymphocytic leukaemia with defects in TP53. *Br J Haematol* 2014;**167**:149–61.
27. DeNicola M, Pullarkat S, Yea S, Rao N, Yang L, Tirado CA. Hyperdiploidy in CLL/SLL: a rare cytogenetic event associated with poor prognosis. *J Assoc Genet Technol* 2014;**40**:22–4.
28. Vundinti BR, Korgaonkar S, Kerketta L, Ghosh K. A rare case of B-cell chronic lymphocytic leukemia with t(2;14)(p13;q32), +X, +11, +12, +13, der(1p) karyotype. *Indian J Cancer* 2011;**48**:387–8.
29. 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**:1177–84.
30. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, *et al.* TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010;**28**:4473–9.
31. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, *et al.* Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol* 2011;**29**:2223–9.
32. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, *et al.* TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010;**24**:2072–9.
33. Watanabe A, Inokuchi K, Yamaguchi H, Mizuki T, Tanosaki S, Shimada T, *et al.* Near-triploidy and near-tetraploidy in hematological malignancies and mutation of the p53 gene. *Clin Lab Haematol* 2004;**26**:25–30.
34. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;**111**:5446–56.

### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** Univariate log rank analysis. (A) Time to first therapy (TTFT). (B) Overall Survival (OS).

**Table S2.** Multivariate Cox regression analysis. (S2A) Time to first therapy (TTFT). (S2B) Overall Survival (OS).



# 8 DISCUSIÓN GENERAL



---

La LLC es una enfermedad muy heterogénea tanto clínica como biológicamente. Indudablemente, el estado mutacional del gen *IGHV* y las alteraciones citogenéticas detectadas por FISH se han consolidado como dos de los factores pronósticos más relevantes, pues son capaces de estratificar a los pacientes según el riesgo de progresión de la enfermedad (96,97,126). De hecho, a día de hoy, la FISH es una de las pruebas recomendadas antes de iniciar tratamiento en todos los pacientes, y cada vez hay más evidencia de que el estado mutacional también se debería realizar como factor pronóstico y, posiblemente, en la elección de tratamiento (9,100).

En los últimos 20 años, se han publicado muchos trabajos que confirman el valor pronóstico de la FISH y del estado mutacional de *IGHV*, y que identifican algunas particularidades de subgrupos de pacientes al utilizar estas técnicas. Sin embargo, aún quedan algunos aspectos que son objeto de controversia o que no se han estudiado más ampliamente. Además, actualmente nos encontramos en un momento de expansión y renovación del arsenal terapéutico, tras la incorporación de los nuevos tratamientos dirigidos a nuevas vías de señalización del linfocito B, y de la aparición de nuevos anticuerpos monoclonales u otros tratamientos basados en la biología de la enfermedad (79,80,83,86–88). Las alteraciones citogenéticas determinadas mediante FISH y el patrón mutacional de *IGHV* se utilizan en la actualidad para la toma de decisiones terapéuticas y, en consecuencia, su mayor conocimiento podrá ayudar a dar un paso más hacia la medicina personalizada. En este contexto surgieron las preguntas a las que pretende responder esta Tesis Doctoral: la primera parte se centra en el estado mutacional de *IGHV*, y la segunda, y más extensa, en la FISH.

Para el primer bloque de esta Tesis, se dispuso de una base de datos de pacientes con LLC procedentes de la región central y del noroeste de España. En ella se analizaron el estado mutacional de *IGHV*, cuáles son las familias VH más frecuentemente utilizadas, su asociación con alteraciones citogenéticas, con otros factores pronósticos y con la SG y el TPT. Como se ha mencionado en la introducción del presente trabajo, las familias VH tienen una asociación geográfica particular, probablemente por predisposición genética y/o exposición a antígenos ambientales concretos. Diferentes publicaciones han documentado las preferencias de familias VH en distintas regiones geográficas (Ucrania, Argentina, China, Italia o Escandinavia, entre otros), y su asociación con características clínicas y biológicas específicas (107,111,179). En nuestro entorno, las características de las familias VH no se habían descrito previamente, por lo que se decidió efectuar su análisis en una serie representativa de pacientes de las regiones del centro y noroeste de España.

En la segunda parte de esta Tesis, se plantearon varias preguntas relacionadas con las anomalías genéticas observadas mediante FISH en pacientes con LLC. Nuestro grupo de investigación ha sido uno de los pioneros en demostrar que el porcentaje de células con pérdidas en 13q y 11q tiene valor pronóstico, ya que identifica subgrupos de pacientes con diferente curso clínico (139,145). Además, otros grupos han confirmado estos hallazgos incluso en los enfermos con 17p- (138,146,166). Sin embargo, en el caso de la trisomía del cromosoma 12, un subgrupo de pacientes especialmente heterogéneo, no existía evidencia previa de la importancia del porcentaje de células con esta alteración en el curso clínico. Por tanto, se seleccionaron los casos con +12 de la base de datos del GCEGCH y GELLC. Una de las observaciones de este trabajo fue que había pacientes con +12 que presentaban además alteraciones adicionales por FISH. De hecho, en la práctica clínica habitual no es infrecuente encontrar enfermos con más de una alteración, lo que genera incertidumbre acerca del comportamiento de estos casos. Por otra parte, cada vez existe más evidencia del impacto clínico que ocasiona el cariotipo complejo en la LLC, al seleccionar un grupo de pacientes de riesgo muy alto (175,178). A la luz de estos hallazgos se analizó cómo son los pacientes que presentan más de una alteración citogenética por FISH, y para ello se identificaron los casos con más de una alteración de la misma base de datos del GCEGCH y GELLC.

Por último, en la base de datos utilizada en el primer trabajo de esta Tesis Doctoral, se objetivó que, de forma excepcional, había casos con ganancias cromosómicas en la mayoría de las sondas FISH utilizadas, lo que podría equivaler a un cariotipo hiperdiploide. El cariotipo hiperdiploide es una alteración conocida en otras patologías hematológicas como el mieloma múltiple, la leucemia aguda mieloblástica y linfoblástica. Es bien sabida su relación con un pronóstico mejor en aquellos pacientes con mieloma y leucemia linfoblástica (180,181). Sin embargo, en la LLC, hasta la fecha, esta alteración se ha documentado de forma muy excepcional, únicamente en dos publicaciones anecdóticas, y en ambas asociado con pronóstico deletéreo (182,183). Por tanto, se realizó una búsqueda en la base de datos de pacientes con LLC del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, que analiza muestras de múltiples instituciones, con el objetivo de revisar la frecuencia, características clínicas y pronóstico de este subgrupo de enfermos.

A continuación se expone una discusión detallada de cada trabajo de los que se compone esta Tesis Doctoral.

## **8.1 El estado mutacional de *IGHV* en una cohorte de pacientes de la región central y noroeste de España**

### **8.1.1 Los enfermos con mutaciones somáticas en *IGHV* presentan buen pronóstico**

Las mutaciones somáticas en *IGHV* se detectan en aproximadamente el 50% de los pacientes con LLC y dividen dos subgrupos con diferente curso clínico (42,64,96–99). En el primer trabajo de esta Tesis, que incluía pacientes con LLC de la región central y noroeste de España, se observó que el 56% de los sujetos tenían un patrón mutado en *IGHV*, y el 44% restante patrón no mutado. Estos porcentajes se obtuvieron al establecer el punto de corte en el 98% de homología con respecto al gen más cercano de la línea germinal. Esta proporción es similar a la documentada en otros estudios realizados en países occidentales (97,108). El punto de corte de 98% es el estándar, y, entre otros, el recomendado por el grupo ERIC (*European Research Initiative on CLL*), ya que es el que más ampliamente ha demostrado diferenciar subgrupos pronósticos. Aun así, persiste cierta controversia sobre cómo considerar a los casos límites entre 97-97,9%, puesto que el grupo inglés ha publicado que algunos de éstos podrían comportarse como no mutados (184).

Nuestro estudio también confirma el valor pronóstico del estado mutacional de *IGHV*. Los pacientes con perfil mutado fueron los que mayor supervivencia y mayor tiempo hasta recibir tratamiento tuvieron (**Figura 2, capítulo 4**). Este hecho se pudo confirmar con el punto de corte de 98% de homología pero también con el de 96%. Así, un meta-análisis reciente en el que está incluido nuestro artículo, ha puesto de manifiesto el gran beneficio en la SG y en el tiempo hasta la progresión (TP) en los pacientes mutados (mediana de SG entre 17,9 y 25,8 años y de TP entre 9,2 y 18,9) frente a los pacientes no mutados (mediana de SG entre 3,2 y 10 años y de TP entre 1 y 5 años) (100). En la actualidad se considera que el poder pronóstico del estado mutacional de *IGHV* es de gran relevancia. Recientemente, se han publicado algunos trabajos que confirman que los pacientes con perfil mutado tras tratamiento con FCR, consiguen alcanzar una meseta en las curvas de TP y SG a largo plazo. Esto ocurre, sobre todo, en los que consiguen una EMR negativa, lo que permite especular incluso con la posible curación de algunos de estos enfermos. Por todo ello, la inmunoterapia con FCR se ha consolidado como tratamiento de primera línea en los pacientes menores de 65 años y buen estado general, fundamentalmente con perfil mutado (185–187). Por otra parte, otros estudios han demostrado que los pacientes con perfil no mutado responden igual de bien a inhibidores de BCR o de BCL-2 que los mutados, con resultados mejores que la inmunoterapia, lo cual podría situar a alguna de estas

moléculas como preferibles en el tratamiento de primera línea en los pacientes sin mutaciones somáticas en *IGHV* (105,188). Por consiguiente, conocer el estado mutacional de los pacientes jóvenes con LLC no solo aporta información del pronóstico que van a presentar estos pacientes, sino también acerca de cuál es la mejor opción terapéutica para ellos.

### **8.1.2 La distribución de familias y segmentos VH es heterogénea según la zona geográfica y existe una relación entre determinados segmentos VH con el estado mutacional y el pronóstico**

Los linfocitos de la LLC tienen un uso preferencial por algunas familias y segmentos génicos de la región VH, de modo que las familias VH1, VH3 y VH4, y los segmentos VH1-69, VH2-23, VH3-07 y VH4-34 son los más frecuentemente utilizados. Además, algunas familias y segmentos génicos se asocian característicamente con: (a) una distribución geográfica heterogénea, (b) patrones no mutados o mutados según la familia VH y (c) características particulares de la LLC (97,108,109).

En cuanto a la distribución geográfica, se ha visto que en los países occidentales las familias más usadas son la VH1 y la VH3, mientras que en los países orientales la VH3 y VH4 (108–110). En esta línea, en nuestro estudio las familias y los segmentos más frecuentes fueron: VH3 (49,5%), VH1 (25,5%) y VH4 (10%) y, más específicamente, VH3-30 (10%), VH1-69 (9,7%), VH3-23 (8,8%), y VH4-34 (8,3%). Las teorías que explican estas diferencias territoriales se basan no solo en el trasfondo genético según las razas o etnias, sino también en la existencia de diferentes antígenos ambientales que seleccionan usos preferenciales por familias VH en los diferentes países (107,108).

Dentro de la familia VH3, los segmentos más utilizados en los pacientes de nuestro estudio fueron VH3-30 y VH3-23, mientras que VH3-7, VH3-11 y VH3-21 se observaron en una proporción baja de sujetos. En los enfermos que utilizaron VH3-30 no se encontraron preferencias por el estado mutacional ni se correlacionó con el pronóstico. Sin embargo, el uso de VH3-23, y VH3-7 se asoció con el patrón mutado, aunque no se pudo relacionar con el pronóstico. Estos hallazgos son acordes con publicaciones previas (110,114), si bien el valor pronóstico de VH3-23 es controvertido. Parece que dentro de los pacientes con mutaciones de *IGHV* puede separar un subgrupo de peor pronóstico (189), aunque otros estudios no lo han confirmado (114). En los pacientes de nuestra serie, se observó una tendencia a una SG peor ( $P=0,069$ ). El uso de VH3-21 se evidenció en el 3,2% de los pacientes, lo que no es sorprendente, pues ya se sabe que es más infrecuente en las regiones del sur de Europa. Además, se relaciona con el perfil *IGHV* mutado pese a ser un marcador

consolidado de mal pronóstico. De hecho algunos estudios consideran los casos de LLC con VH3-21 como una entidad independiente (190). Aunque se observó una tendencia a un menor TPT ( $P=0,07$ ), en nuestro estudio no se pudo confirmar el mal pronóstico de este marcador, probablemente por la escasa representación de este gen en las poblaciones mediterráneas. Por último, a diferencia de los demás miembros de la familia, VH3-11 se asoció con el perfil no mutado en todos los casos, y con alteraciones citogenéticas de mal pronóstico. Además, de forma novedosa, en este subgrupo se evidenció una SG peor ( $P=0,0025$ ). Estos hallazgos deberían interpretarse de forma cautelosa por el escaso número de pacientes con VH 3-11 incluidos, aunque son los esperados para un subgrupo con perfil no mutado.

En cuanto a la familia VH1, VH1-69 fue el gen más utilizado (9,7%), y en la mayoría de los pacientes presentó un perfil no mutado (18/21). Además, se asoció con unos TPT y SG más cortos ( $P=0,002$  y  $P=0,021$ , respectivamente) y una incidencia mayor de segundas neoplasias. Todos estos resultados son similares a los publicados en poblaciones occidentales, sobre todo en pacientes mediterráneos y ucranianos (108,179).

La familia VH4 se ha relacionado con casos de LLC mutada. En nuestro trabajo se ha confirmado este hallazgo, así como un mayor TPT ( $P=0,001$ ). Además, el gen más usado dentro de esta familia fue el VH4-34, también acorde con lo publicado previamente (191).

Por último, al igual que en otros estudios, independientemente de la distribución geográfica, se encontró una representación escasa de las familias VH2, VH5, VH7, y ausencia de la familia VH6 (111). Sin embargo, como hallazgo novedoso, se observó que VH5-51 fue el gen mayoritario en la familia VH5 (8 de 9 pacientes). Todos los pacientes que lo presentaron eran varones y tuvieron un TPT más corto ( $P=0,01$ ) y una tendencia a una SG peor ( $P=0,057$ ). Dos estudios realizados con pacientes mediterráneos (108) y serbios (114), han puesto de manifiesto también el uso de este gen en torno a un 2% de sus casos. En ninguna de estas dos publicaciones se detectó una relación con el pronóstico en esta familia. Por tanto, se necesita la publicación de información adicional para confirmar el valor pronóstico de esta región génica, aunque nuestro trabajo sugiere que se trata de un subgrupo de riesgo alto.

### **8.1.3 Las alteraciones citogenéticas de buen pronóstico se asocian con mutaciones en IGHV y las de mal pronóstico con perfil no mutado**

En la mayoría de los estudios, el perfil mutado se ha relacionado con otras características de buen pronóstico como la 13q-, mientras que los casos no mutados se

asocian preferentemente con 17p-, 11q- y +12 (169,192,193). Por otra parte, existe evidencia de que el estado mutacional subdivide también grupos pronósticos en los pacientes con una misma alteración, como ocurre en las pérdidas de 13q, 11q, 17p. Estos hallazgos no se han confirmado en los enfermos con +12 (194). En nuestro estudio se evidenció que los casos sin mutaciones somáticas se relacionan con alteraciones citogenéticas de mal pronóstico como la 11q- o la 17p-, y la 13q- con casos mutados. En el caso de la +12, estos pacientes tienen característicamente un pronóstico intermedio, aunque se asocien con patrón no mutado de *IGHV*. Como se verá en la siguiente sección de la discusión, la asociación de +12 con perfil no mutado se detectó en este primer trabajo y en la siguiente publicación que compone esta Tesis, en la que se incluyó una muestra más amplia de pacientes con esta alteración.

### 8.2 Características de los pacientes con LLC y trisomía del cromosoma 12

Tal y como se acaba de mencionar, los pacientes con LLC y +12 se han considerado clásicamente como un subgrupo de pacientes con pronóstico intermedio (126). A día de hoy se conoce que esta alteración se puede considerar favorable en ausencia de otros marcadores de mal pronóstico (65). El hecho de que algunos de los sujetos con LLC y +12 se asocien preferencialmente con marcadores de mal pronóstico como *NOTCH-1* o la ausencia de mutaciones en *IGHV*, hace pensar que se trata de un subgrupo de pacientes muy heterogéneo.

Por otra parte, se ha demostrado que existe heterogeneidad clínica dentro de otros subgrupos citogenéticos. Por ejemplo, en las deleciones más frecuentes (13q-, 11q-, 17p-) el porcentaje de las pérdidas es capaz de dividir pacientes con diferente evolución clínica (139,146,166). Bajo estas premisas se decidió investigar las características de los individuos con +12, así como la importancia del porcentaje de la trisomía en el pronóstico. Para ello, se utilizó la base de datos del GELLC y GECGH, y se identificaron los casos con +12. Se detectó esta anomalía en el 13,9% de los pacientes. Las medianas de SG y de TPT en los casos con +12 fueron de 129 meses y 42 meses, respectivamente. Estos resultados están en la misma línea que lo descrito previamente en la literatura, que sitúan la incidencia de la +12 en torno al 15%, y las medianas de SG y TPT en 111 meses, y 32 meses, respectivamente, lo que hace que nuestra cohorte sea válida y representativa (126).

Las características clínicas de los pacientes incluidos también fueron similares a las de otros estudios. Se encontró que los enfermos con +12 tenían una mediana de edad de 68 años al diagnóstico, con un predominio de varones, y una mayoría de casos con estadios

tempranos de Binet, carga linfocitaria baja, niveles normales de B2M, ausencia de CD38 y de organomegalias. Además, se detectó un predominio de casos con perfil no mutado, como es de esperar en los pacientes con LLC y +12.

De forma simultánea a la publicación de nuestro trabajo, el grupo de la *MD Anderson Cancer Center* comunicó los resultados de una serie de 250 pacientes con LLC y +12. Aunque las dos series de enfermos fueron parecidas, el grupo de pacientes americanos era más joven (únicamente el 37% eran mayores de 65 años) e incluía un mayor porcentaje de casos con alta expresión de CD38 (195). La conclusión fundamental de su trabajo fue que el síndrome de Richter y las segundas neoplasias constituyen las causas principales de muerte en los sujetos con +12. Posiblemente, debido a la menor edad de los pacientes del grupo del MDACC, únicamente fallecieron 18 (7%), y el porcentaje de segundas neoplasias fue del 9% (22 pacientes). En nuestra publicación no se analizaron estos datos en detalle. Sin embargo, tras una revisión de los mismos, se observó una tasa de mortalidad del 21,8% (69 casos). Curiosamente se detectó un mayor número de pacientes con segundas neoplasias, y en sólo 8 de los 41 (14%), esta fue la causa de la muerte. Probablemente estas diferencias pueden explicarse por la diferencia de edad entre las dos cohortes. En el caso del síndrome de Richter, observamos datos similares al identificar 5 casos (1,7%) que fallecieron por este motivo todos ellos.

### 8.2.1 El porcentaje de células con +12 por FISH subdivide grupos con diferente curso clínico

El trabajo de investigación realizado en esta publicación ha permitido identificar, de forma novedosa, que tener un porcentaje de células con +12  $< 0 \geq$  al 60%, es capaz de dividir a los pacientes en 2 grupos con diferente SG y TPT (**Figura 2, Capítulo 5**). En el análisis multivariado realizado en este estudio, el efecto de esta variable se mantuvo en el TPT. Además, los sujetos con un mayor porcentaje de células mutadas tenían un recuento leucocitario y linfocitario mayor; mayores niveles de LDH y B2M; más esplenomegalia y debutaban con estadios de Binet más avanzados. Por tanto, nuestro estudio ha sido pionero en identificar el valor del porcentaje de células alteradas por FISH en los pacientes con LLC y trisomía 12. Recientemente, el grupo de la clínica Mayo ha confirmado estos datos a partir de una base de datos de 1.585 pacientes, de los cuales, 205 (13%) presentaron +12. También con el punto de corte de 60% encontraron 2 subgrupos de pacientes con diferente TPT, aunque en su publicación no reflejan si hubo diferencias en la SG (140). En el caso de las deleciones de 11q y 13q, nuestro grupo de investigación ha demostrado que los casos de LLC que presentan un porcentaje alto de pérdidas celulares son más inestables

genéticamente, lo que hace posible que la enfermedad evolucione desfavorablemente al acumular mutaciones genéticas adicionales (141,145). Sin embargo, en nuestro estudio no se pudo realizar el análisis de mutaciones, ni por tanto confirmar esta teoría para la +12, lo que podría ser objeto de investigaciones futuras.

### 8.2.2 Otras características que predicen la SG y el TPT en los pacientes con +12

Con la intención de poder predecir qué pacientes con +12 podían tener un mejor pronóstico, se analizaron también otros factores que pudieran relacionarse con la SG y el TPT. La mayoría de los pacientes de nuestra cohorte necesitaron tratamiento (60,6%), con un TPT de 42 meses. Sin embargo, la SG estimada de estos casos fue bastante mayor (129 meses). Se especula que estas diferencias pueden deberse al hecho de que, en general, los linfocitos con +12 expresan con mayor intensidad el CD20 y por tanto pueden ser más susceptibles a los tratamientos con inmunoterapia (196). En el análisis univariado, las variables asociadas a un TPT peor fueron el estadio avanzado según la clasificación de Binet, tener síntomas B, la esplenomegalia, el recuento linfocitario elevado, los niveles elevados de LDH, y la delección de 11q. En el análisis multivariado, las únicas variables incluidas en el modelo final fueron el porcentaje de células con trisomía, el estadio clínico avanzado, los síntomas B, 11q- y la linfocitosis elevada. En el trabajo antes referido del MDACC, los factores significativos en el análisis multivariado fueron la esplenomegalia, el estadio clínico avanzado de Rai y tener una delección 14q. Ellos no investigaron el poder del porcentaje de las células con trisomía y excluyeron los casos con 11q- de su análisis, con lo que las variables para predecir el TPT fueron prácticamente las mismas en los dos estudios (195).

En cuanto a la SG, el estadio de Binet avanzado, la carga adenopática, la esplenomegalia, los niveles elevados de LDH y de B2M, así como la expresión de CD38 fueron los factores significativos en el análisis univariado. En el multivariado solo el estadio de Binet, los niveles de B2M y las pérdidas en 11q mantuvieron su poder discriminatorio. En la cohorte publicada por el MDACC los factores que predecían una SG peor en el multivariado fueron la leucocitosis extrema y el desarrollo de segundas neoplasias. En nuestro estudio, este último factor no se tuvo en cuenta en el análisis.

En relación al estado mutacional de *IGHV*, pese a que hubo un predominio de pacientes con perfil no mutado, no se observó valor pronóstico asociado a esta variable dentro de nuestra cohorte. Esto ya se había documentado en otros estudios con +12 (194).

Por último, se evidenció que el 19% de los individuos de nuestra serie tenían alteraciones múltiples por FISH, además de la trisomía 12, proporción también similar a la comunicada previamente (149). La pareja que con mayor frecuencia acompañó a la +12 fue la 13q- (39 casos), seguida por la 17p- (14 casos) y, por último, la 11q- (9 casos). Como se ha referido previamente, únicamente el tener una 11q- aportó pronóstico adicional a los casos con +12. No se detectó que los individuos con 17p- tuvieran un pronóstico peor, posiblemente por el bajo número de casos. Quizás las diferencias observadas en el grupo de la 11q- se deban a que casi todos los pacientes con esta alteración presentaban la delección en más del 25% de las células (145). En cualquier caso, el siguiente trabajo que compone esta Tesis Doctoral, estudia a fondo los casos de pacientes con alteraciones citogenéticas múltiples determinadas por FISH en la LLC.

### 8.3 Características de los pacientes con alteraciones múltiples (AM) detectadas por FISH

Con el objetivo de conocer la incidencia y características de los pacientes con AM por FISH en la LLC se realizó una selección de los casos con estas alteraciones en la misma base de datos que se usó en el estudio previo (Base de Datos del GELLC y GECGH).

Se detectó que un 15,4% de los pacientes (323 del total de los 2.095 enfermos) presentaban más de una alteración por FISH al utilizar las 4 sondas más habituales (11q22/ATM, 12q13, 13q34, y 17p13/TP53). A día de hoy ésta es la serie publicada que incluye más casos con AM por FISH. La incidencia de casos con AM que se encontró en nuestra población es similar a lo descrito previamente al utilizar el mismo panel de FISH (122,137,172).

Las características de los pacientes fueron similares a las descritas en series previas de pacientes con LLC (**Tabla 1, Capítulo 6**). En la mayoría de los casos (63%), las AM estaban presentes desde el momento del diagnóstico, mientras que en el 37% restante fueron adquiridas durante la evolución de la enfermedad. Al analizar si había diferencias en las características de los pacientes en función del momento de adquisición de las AM, se observó que los pacientes con AM al diagnóstico eran más mayores, con niveles más elevados de B2M, estadios clínicos avanzados y mayor carga adenopática. Estas diferencias se pueden explicar porque las características de los pacientes con AM adquiridas durante la evolución de la enfermedad fueron recogidas en el momento del diagnóstico. Además, hubo más casos con AM adquiridas durante la evolución de la enfermedad que precisaron recibir tratamiento, lo que es esperable dado que el estudio FISH se suele realizar antes de iniciar tratamiento

para la LLC. No se detectaron otras diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes.

En nuestra serie el 1,7% de los pacientes presentaron un síndrome de Richter, incidencia quizás algo inferior a lo esperado (2-7%), si se tiene en cuenta que había pacientes que ya presentaban una evolución previa de su enfermedad (casos con AM durante la evolución) (197). Esto hace sospechar que la incidencia de síndrome de Richter no está aumentada en casos con AM por FISH. Debido al carácter multicéntrico y retrospectivo de los datos de nuestra base, esta observación debe interpretarse cuidadosamente ya que la incidencia de síndrome de Richter podría estar infraestimada. En cualquier caso, es de destacar que los 5 pacientes que evolucionaron a síndrome de Richter presentaban +12 junto con otra alteración, en casi todos los casos, de mal pronóstico (11q- o 17p-). Aunque no se dispuso de los datos moleculares, posiblemente estos casos con +12 tendrían la mutación *NOTCH-1*, tal y como se ha descrito en trabajos previos (54,156). Por tanto se podría concluir que para que se desarrolle un síndrome de Richter no solo hace falta presentar la +12, sino alguna alteración secundaria que pueda generar inestabilidad genética como podría ser 11q-, 17p- o posiblemente mutación de *NOTCH-1* (195).

### **8.3.1 La distribución entre las AM no es homogénea al ser las alteraciones más frecuentes 13q- con 11q- o 17p- y la menos frecuente 11q- con 17p-**

De forma parecida a lo publicado por otros autores, se observó que las anomalías citogenéticas no estaban agrupadas aleatoriamente. Así, se evidenció un exceso de casos de 13q- con una alteración de riesgo alto (11q- o 17p-) con respecto a lo esperable por la frecuencia de cada alteración individualmente (137,172). Estas 2 parejas supusieron el 58,2% de la serie, mientras que la siguiente combinación en frecuencia (13q- con +12) supuso el 15,8%.

### **8.3.2 Las +12 y 13q- son eventos iniciales, mientras que 17p- se adquiere de forma más tardía en la evolución de la LLC**

El grupo de Landau *et al.* utilizó técnicas de secuenciación masiva para analizar la evolución clonal en la LLC (130). Encontraron que tanto la 13q- como la +12 son dos alteraciones iniciales en la patogénesis de esta enfermedad y, en su trabajo, prácticamente excluyentes. Sin embargo, ya había evidencias previas de que ambas anomalías citogenéticas pueden coincidir en torno a un 17% de los casos con AM o a un 4% de todos los pacientes con LLC, como confirma nuestro trabajo (168,173). Además, en los casos con 13q- y +12 de nuestra serie, estas alteraciones se observaban en proporciones similares en el estudio de

FISH. Por tanto se puede inferir que en los casos en las que ambas concurren es a partir de un solo clon celular. A diferencia, se vio que en los casos en los que 13q- y +12 se combinaban con otras alteraciones, estas aberraciones solían constituir clones mayoritarios. En cambio, 17p- se observó en proporciones celulares inferiores, lo que indica que tanto 13q- como +12 son eventos iniciales en la LLC. De hecho, en los casos con AM adquiridas durante la evolución de la enfermedad y con un estudio FISH disponible al diagnóstico, cualquiera de estas dos alteraciones se podía ver ya en el clon inicial en un 61% de los casos.

#### 8.3.3 Los pacientes con AM desde el diagnóstico presentan una SG y TPT similares a los pacientes de alto riesgo citogenético

El análisis de supervivencia se realizó únicamente en los casos en los que las AM se habían detectado desde el momento del diagnóstico, para evitar los efectos en los resultados de los tratamientos y la posible evolución clonal fruto de la evolución de la enfermedad. Para ello se comparó este grupo de pacientes con los 1.501 casos procedentes de la misma base de datos, sin AM y cuyo análisis citogenético por FISH se hubiera realizado también al diagnóstico de la enfermedad. De este modo se pudo observar que los pacientes con AM (incluyendo todo tipo de combinaciones y FISH-complejo) presentaron SG (76 meses) y TPT (27 meses) cortos (**Figura 1, Capítulo 6**). Estos resultados sugieren que este grupo de pacientes, con más de una alteración citogenética por FISH, es de riesgo alto, lo cual no es sorprendente puesto que el 84,1% de estos casos albergaban 11q-, 17p- o FISH-complejo.

Adicionalmente, se analizó si había alguna diferencia entre los pacientes con FISH-complejo y 17p-, ya que ambos grupos se consideran de riesgo muy alto. Se pudo observar que los casos con FISH-complejo tuvieron la SG más corta, seguidos de los casos con 17p- y otra alteración en comparación con los casos con dos alteraciones que no fuesen 17p. Dos estudios recientes corroboran estos mismos resultados en individuos con LLC y cariotipo complejo realizado por citogenética convencional o con adición de mitógenos (175,178). Estas observaciones son relevantes puesto que, al considerar que el FISH-complejo constituye un grupo riesgo de muy alto, se podría asumir que estos casos son similares a los que presentan un cariotipo complejo en las situaciones en las que no se disponga de cariotipo convencional. Además, en la era de los tratamientos dirigidos, se ha comunicado por algunos autores que para predecir fracaso terapéutico, presentar un cariotipo complejo podría ser un marcador más importante incluso que las mutaciones en *TP53* (177).

Nuestro estudio no está exento de limitaciones. Probablemente, la más destacable sea la ausencia de cariotipos convencionales, que puede haber subestimado la cifra de casos con cariotipo complejo.

Por último, el único grupo de pacientes con AM sin pronóstico malo fue el compuesto por 13q- y +12. En estos casos se pudo observar que el TPT era más similar al de los pacientes con +12 que a los de 13q- como únicas anomalías, lo que corrobora que la alteración que mejor pronóstico aporta a la LLC es la 13q-, aunque solo si ocurre en como anomalía única (126).

### **8.4 Características de los pacientes con hiperdiploidía detectada por FISH**

En este último trabajo, se analizó la incidencia y significado pronóstico de la hiperdiploidía en la LLC. Para ello se utilizó una base de datos del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, que incluye todos los casos de LLC a los que se les solicitó un estudio citogenético mediante FISH, procedentes tanto de Salamanca como de otros hospitales para el cual éste es el de referencia. En el análisis de supervivencia de este artículo se utilizó un grupo control que incluía una selección de 633 pacientes sin ganancias cromosómicas y con datos de seguimiento completos de esta misma base de datos.

Hasta la fecha, los casos de LLC con cariotipo hiperdiploide solo se habían comunicado de forma anecdótica en dos artículos, y en ambos asociado con pronóstico malo (182,183), a diferencia de lo que ocurre en otras patologías como el mieloma múltiple.

#### **8.4.1 La hiperdiploidía en la LLC es un hallazgo muy infrecuente**

En nuestro estudio se pudo confirmar que la hiperdiploidía en la LLC es un hallazgo excepcional, puesto que se observó en menos del 1% de los casos de nuestra serie que incluyó 1.359 pacientes con LLC. Esta es la primera cohorte de casos con hiperdiploidía y LLC publicada hasta la fecha, lo que nos permitió analizar mejor las características de estos pacientes y su asociación con factores pronósticos.

#### **8.4.2 La hiperdiploidía se asocia con factores de mal pronóstico para la LLC**

La otra conclusión importante de esta publicación, es que las LLC con hiperdiploidía contienen otros factores de mal pronóstico, y posiblemente constituyan en sí mismas otro factor adicional de alto riesgo para la LLC, si bien la mayoría de nuestros casos debutaron como estadios iniciales, según la clasificación de Binet.

La mayor parte de los pacientes con hiperdiploidía (86%) necesitaron tratamiento en un periodo de tiempo muy corto desde el diagnóstico (1,4 meses), significativamente inferior al del grupo control. Además, las respuestas al tratamiento fueron de escasa duración (7 meses de mediana), y una gran parte de los enfermos necesitaron recibir otras líneas de tratamiento (mediana de 3). En consonancia, la SG de los pacientes con hiperdiploidía fue más corta (66 meses) que la del grupo control (147 meses) (**Figura 1, Capítulo 7**) desde el momento del diagnóstico, aunque peor aún desde el momento en el que se detectó la hiperdiploidía (20 meses). En la mayoría de los sujetos, la hiperdiploidía se detectó desde el diagnóstico y solo en un 29% de estos a consecuencia de la evolución de la enfermedad y después de algún tratamiento.

Dentro de los factores de mal pronóstico para la LLC se observó que todos los casos en los que se disponía del estado mutacional presentaban un perfil de *IGHV* no mutado (**Tabla 2, Capítulo 7**). No se pudo establecer una relación significativa entre el estado no mutado y la hiperdiploidía en comparación con el grupo control, probablemente por el número bajo de casos hiperdiploides, aunque sí una tendencia ( $P=0,05$ ). En cuanto al FISH, se observó que en el 57% de los casos se detectó alguna alteración citogenética adicional, mayoritariamente de riesgo alto. Con respecto al grupo control, en este caso sí se detectó una asociación significativa entre 17p- y la hiperdiploidía ( $P=0,04$ ) (**Tabla 3, Capítulo 7**).

Debido a la gran importancia que han demostrado las mutaciones de *TP53* en la LLC al considerarse, quizás, el factor pronóstico más importante en esta enfermedad (49,69,198), se tuvo la ocasión de analizar el estado de este gen en los pacientes de nuestro estudio con hiperdiploidía. Así, se detectó un caso con *TP53* mutado, sin 17p-. Por tanto, 3 de los 7 casos con hiperdiploidía presentaron alguna alteración de *TP53* (**Tabla 2, Capítulo 7**). La asociación entre las mutaciones de *TP53* y los cariotipos hiperdiploides se ha comunicado previamente en otras neoplasias hematológicas, aunque no en la LLC (199). Es ampliamente conocido que las alteraciones de *TP53* son eventos tardíos en la evolución de la enfermedad y suelen ocurrir a consecuencia de evolución clonal o después de tratamientos (131). Curiosamente, los 3 casos con alteraciones de *TP53* tenían una carga mutacional elevada, al estar este clon en un porcentaje elevado de la población patológica, y el clon hiperdiploide en una población menor. Este hecho sugiere que la hiperdiploidía puede ocurrir a consecuencia de la inestabilidad genómica producida por las alteraciones de *TP53* e incluso ser un evento aún más tardío.

Este estudio presenta algunas limitaciones. Una de ellas es que debido a la proporción escasa de individuos con hiperdiploidía, no se puede asegurar que el mal pronóstico

observado en estos casos se deba claramente a esta alteración, o sea un factor de confusión, debido a las otras alteraciones de pronóstico peyorativo presentes en estos pacientes (mutaciones en *TP53*, FISH de alto riesgo o estado mutacional de *IGHV* no mutado). Pero, sin duda, la mayor limitación es la ausencia de citogenética convencional para confirmar el cariotipo hiperdiploide, así como excluir otras alteraciones adicionales que justifiquen un cariotipo complejo. Lamentablemente, no se dispuso de esta información, ya que las guías actuales de diagnóstico y tratamiento de la LLC no la incluyen como una prueba a realizar (9). De todos modos, se utilizaron los resultados de las alteraciones citogenéticas determinadas mediante FISH para considerar los cariotipos hiperdiploides, ya que en todos los casos se observaron las mismas ganancias en la misma proporción de células con la alteración.

Existe controversia acerca de si las ganancias cromosómicas deben considerarse como una alteración más a la hora de definir un cariotipo complejo en la LLC o no (120). En caso afirmativo, dos de los casos de nuestra serie podrían considerarse entonces como cariotipos complejos, alteración ligada a un pronóstico infausto en la LLC, como se ha mencionado en capítulos anteriores de esta Tesis Doctoral (118). Por tanto, en los pacientes con LLC e hiperdiploidía, tampoco se podría asegurar que el mal pronóstico detectado se deba al cariotipo complejo o hiperdiploide. Para aclarar esta premisa sería deseable contar con otros estudios que incluyan casos hiperdiploides, preferiblemente con citogenética convencional.

# 9 CONCLUSIONES



---

A continuación, se presentan las principales conclusiones del presente trabajo:

- Los resultados de nuestro estudio reproducen que el estado mutacional del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas es uno de los marcadores pronósticos más potentes en la LLC. Es capaz de diferenciar dos subgrupos de pacientes diferentes: los de perfil mutado (SG y TPT mejores, y asociación con alteraciones citogenéticas de buen pronóstico) y los no mutados (SG y TPT peores y alteraciones citogenéticas de mal pronóstico).
- Las familias y los segmentos génicos de VH muestran una distribución territorial heterogénea, que en el caso de los pacientes de la región central y del noroeste de España, es similar a la de otros países mediterráneos. Además, la identificación del uso de la familia VH y el segmento génico concreto aporta información adicional acerca del curso clínico de los pacientes. En nuestra serie, los segmentos VH 1-69, VH 3-11 y VH 5-51 se asociaron con mal pronóstico. Debido a la baja representación de VH 3-21, no se pudo relacionar con pronóstico malo, aunque sí con el patrón mutado de *IGHV*.
- Los pacientes con LLC y trisomía 12 constituyen un subgrupo de enfermos con pronóstico intermedio y de características heterogéneas. El porcentaje de células con la trisomía es capaz de dividir dos subgrupos de pacientes con diferente SG y TPT, al identificar a aquellos con un porcentaje  $\geq$  a 60% como de pronóstico peor. Otras variables que influyen tanto en la SG como en el TPT son el estadio clínico avanzado según la clasificación de Binet, y la delección del cromosoma 11.
- Las alteraciones múltiples determinadas mediante FISH se detectan en torno a un 15% de los pacientes y la mayoría de ellas desde el diagnóstico de la enfermedad. Existe una predisposición en los casos con 13q- a asociarse con 11q- y 17p-. La asociación de 11q- con 17p- es rara.
- Las alteraciones citogenéticas múltiples confieren mal pronóstico, probablemente por la incidencia elevada de casos con 17p-, 11q- y FISH complejo. Dentro del grupo de riesgo más alto, los casos con FISH-complejo son los de pronóstico peor, seguidos de 17p- junto con otra anomalía. El único subgrupo de pronóstico mejor, dentro de los casos con AM es el de 13q- con +12, cuyos pacientes se comportan más como los casos con +12 que 13q- como única anomalía citogenética.

## 9. Conclusiones

---

- La hiperdiploidía detectada por FISH (ganancia de al menos 3 de las 5 sondas utilizadas) es un hallazgo muy inusual en la LLC, con una prevalencia inferior al 1%.
- Los pacientes con hiperdiploidía tienen otros factores de mal pronóstico, como el estado no mutado de *IGHV*, la existencia de alteraciones citogenéticas de riesgo alto o la presencia de mutaciones de *TP53*. Como consecuencia, la SG y el TPT son más cortas respecto a los enfermos sin hiperdiploidía.

# 10 REFERENCIAS



- 
1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4<sup>o</sup> ed. Lyon: International Agency for Research and Cancer (IARC); 2008.
  2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375–90.
  3. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3724–34.
  4. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1995 Oct 19;333(16):1052–7.
  5. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. 2013 Sep;88(9):803–16.
  6. Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, López A, Henriques AF, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood*. 2009 Jul 2;114(1):33–7.
  7. Vardi A, Dagklis A, Scarfò L, Jelinek D, Newton D, Bennett F, et al. Immunogenetics shows that not all MBL are equal: the larger the clone, the more similar to CLL. *Blood*. 2013 May 30;121(22):4521–8.
  8. 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 Apr;82(4):449–53.
  9. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5446–56.
  10. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, 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 Oct;8(10):1640–5.
  11. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 2000 Mar;4(1):22–47.
  12. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. 1997 Oct;108(4):378–82.
  13. Brandt L. Environmental factors and leukaemia. *Med Oncol Tumor Pharmacother*. 1985;2(1):7–10.

## 10. Referencias

---

14. Goldin LR, Lanasa MC, Slager SL, Cerhan JR, Vachon CM, Strom SS, et al. Common occurrence of monoclonal B-cell lymphocytosis among members of high-risk CLL families. *Br J Haematol*. 2010 Oct;151(2):152–8.
15. Wiernik PH, Ashwin M, Hu XP, Paietta E, Brown K. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2001 May;113(2):407–14.
16. Speedy HE, Kinnersley B, Chubb D, Broderick P, Law PJ, Litchfield K, et al. Germ line mutations in shelterin complex genes are associated with familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016 Nov 10;128(19):2319–26.
17. Goldin LR, McMaster ML, Rotunno M, Herman SEM, Jones K, Zhu B, et al. Whole exome sequencing in families with CLL detects a variant in Integrin  $\beta$  2 associated with disease susceptibility. *Blood*. 2016 Nov 3;128(18):2261–3.
18. Zwick C, Fadle N, Regitz E, Kemele M, Stilgenbauer S, Bühler A, et al. Autoantigenic targets of B-cell receptors derived from chronic lymphocytic leukemias bind to and induce proliferation of leukemic cells. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4708–17.
19. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975 Aug;46(2):219–34.
20. 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 Jul 1;48(1):198–206.
21. Molica S. Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival, and treatment. *Leuk Lymphoma*. 1994 Apr;13(3–4):203–14.
22. Tsiodras S, Samonis G, Keating MJ, Kontoyiannis DP. Infection and immunity in chronic lymphocytic leukemia. *Mayo Clin Proc*. 2000 Oct;75(10):1039–54.
23. Raanani P, Gafter-Gvili A, Paul M, Ben-Bassat I, Leibovici L, Shpilberg O. Immunoglobulin prophylaxis in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma: systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2009 May;50(5):764–72.
24. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015 Sep;26(suppl 5):v78–84.
25. Smith TJ, Bohlke K, Lyman GH, Carson KR, Crawford J, Cross SJ, et al. Recommendations for the Use of WBC Growth Factors: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015 Oct 1;33(28):3199–212.
26. Diehl LF, Ketchum LH. Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia. *Semin Oncol*. 1998 Feb;25(1):80–97.
27. Visco C, Ruggeri M, Laura Evangelista M, Stasi R, Zanotti R, Giaretta I, et al. Impact of immune thrombocytopenia on the clinical course of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1110–6.

- 
28. Tsang M, Parikh SA. A Concise Review of Autoimmune Cytopenias in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017 Feb 14;12 (1):29–38.
  29. Tsimberidou A-M, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer*. 2005 Jan 15;103(2):216–28.
  30. Jamroziak K, Tadmor T, Robak T, Polliack A. Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia: updates on biology, clinical features and therapy. *Leuk Lymphoma*. 2015 Jul;56(7):1949–58.
  31. Hisada M, Biggar RJ, Greene MH, Fraumeni JF, Travis LB. Solid tumors after chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1979–81.
  32. Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CRMC, Maekawa Y, Tamashiro N, Takao TT, et al. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014 Mar;86(2):98–105.
  33. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do K-A, et al. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007 Jun 1;109(11):4679–85.
  34. Molica S, Mauro FR, Callea V, Gentile M, Giannarelli D, Lopez M, et al. A gender-based score system predicts the clinical outcome of patients with early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2005 Apr;46(4):553–60.
  35. Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:138–50.
  36. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 Jul 1;98(1):181–6.
  37. 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 Feb 15;101(4):1262–9.
  38. 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 Mar;45(3):455–62.
  39. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nüchel H, et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2014 Mar 20;32(9):897–904.
  40. Dal Bo M, Bulian P, Bomben R, Zucchetto A, Rossi FM, Pozzo F, et al. CD49d prevails over the novel recurrent mutations as independent prognosticator of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2016 Oct;30(10):2011–8.
  41. 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 May 1;348(18):1764–75.

## 10. Referencias

---

42. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1923–30.
43. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011 Jul 7;475(7354):101–5.
44. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012 Jan;44(1):47–52.
45. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton L-A, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015 Feb;29(2):329–36.
46. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015 Oct 22;526(7574):519–24.
47. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*. 2010 Dec;24(12):2072–9.
48. Dreger P, Schetelig J, Andersen N, Corradini P, van Gelder M, Gribben J, et al. Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood*. 2014 Dec 18;124(26):3841–9.
49. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Oct 10;28(29):4473–9.
50. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*. 2009 Dec 17;114(26):5307–14.
51. Austen B, Powell JE, Alvi A, Edwards I, Hooper L, Starczynski J, et al. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3175–82.
52. Rose-Zerilli MJJ, Forster J, Parker H, Parker A, Rodríguez AE, Chaplin T, et al. ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica*. 2014 Apr;99(4):736–42.
53. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Beà S, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*. 2013 Apr;27(5):1100–6.

- 
54. Rossi D, Rasi S, Spina V, Fangazio M, Monti S, Greco M, et al. Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol*. 2012 Aug;158(3):426–9.
  55. Rossi D, Bruscaggin A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011 Dec 22;118(26):6904–8.
  56. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012 Mar 22;119(12):2854–62.
  57. Martínez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A, Aymerich M, Jares P, Juan M, et al. Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood*. 2014 Jun 12;123(24):3790–6.
  58. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012 Jan 18;481(7381):306–13.
  59. 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 Sep;92(9):1242–5.
  60. Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, Nicoloso MS, Dimitri F, Sampath D, et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*. 2010 Aug 12;116(6):945–52.
  61. Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, Saussoy P, Van Den Neste E, Michaux L, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood*. 2009 May 21;113(21):5237–45.
  62. Kwok M, Rawstron AC, Varghese A, Evans PAS, O'Connor SJM, Doughty C, et al. Minimal residual disease is an independent predictor for 10-year survival in CLL. *Blood*. 2016 Dec 15;128(24):2770–3.
  63. Oscier D, Else M, Matutes E, Morilla R, Strefford JC, Catovsky D. The morphology of CLL revisited: the clinical significance of prolymphocytes and correlations with prognostic/molecular markers in the LRF CLL4 trial. *Br J Haematol*. 2016 Sep;174(5):767–75.
  64. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do K-A, et al. Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Nov 1;29(31):4088–95.
  65. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013 Feb 21;121(8):1403–12.
  66. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, Bergmann MA, Elter T, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 Jul 3;124(1):49–62.

## 10. Referencias

---

67. Visentin A, Facco M, Frezzato F, Castelli M, Trimarco V, Martini V, et al. Integrated CLL Scoring System, a New and Simple Index to Predict Time to Treatment and Overall Survival in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2015 Oct;15(10):612-620.e1-5.
68. Haferlach C, Dicker F, Weiss T, Schnittger S, Beck C, Grote-Metke A, et al. Toward a comprehensive prognostic scoring system in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010 Sep;49(9):851-9.
69. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2016 Jun;17(6):779-90.
70. Delgado J, Doubek M, Baumann T, Kotaskova J, Molica S, Mozas P, et al. Chronic lymphocytic leukemia: A prognostic model comprising only two biomarkers (IGHV mutational status and FISH cytogenetics) separates patients with different outcome and simplifies the CLL-IPI. *Am J Hematol.* 2017 Apr;92(4):375-80.
71. Del Giudice I, Chiaretti S, Tavolaro S, De Propriis MS, Maggio R, Mancini F, et al. Spontaneous regression of chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic features of 9 cases. *Blood.* 2009 Jul 16;114(3):638-46.
72. Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, Liberati A, Loscertales J, Herbrecht R, et al. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009 Sep 10;27(26):4378-84.
73. Fischer K, Cramer P, Busch R, Böttcher S, Bahlo J, Schubert J, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2012 Sep 10;30(26):3209-16.
74. Eichhorst B, Fink A-M, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2016 Jul;17(7):928-42.
75. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2010 Oct 2;376(9747):1164-74.
76. Hillmen P, Gribben JG, Follows GA, Milligan D, Sayala HA, Moreton P, et al. Rituximab plus chlorambucil as first-line treatment for chronic lymphocytic leukemia: Final analysis of an open-label phase II study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2014 Apr 20;32(12):1236-41.
77. Barrientos JC. Sequencing of chronic lymphocytic leukemia therapies. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2016 Dec 2;2016(1):128-36.

- 
78. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. Version 1.2018 [Internet]. [cited 2017 Jun 9]. Available from: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/cll.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cll.pdf)
  79. Hillmen P, Robak T, Janssens A, Babu KG, Kloczko J, Grosicki S, et al. Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2015 May 9;385(9980):1873–83.
  80. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014 Mar 20;370(12):1101–10.
  81. Goede V, Fischer K, Engelke A, Schlag R, Lepretre S, Montero LFC, et al. Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. *Leukemia*. 2015 Jul;29(7):1602–4.
  82. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013 Jul 4;369(1):32–42.
  83. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 Dec 17;373(25):2425–37.
  84. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014 Mar 13;370(11):997–1007.
  85. O'Brien SM, Lamanna N, Kipps TJ, Flinn I, Zelenetz AD, Burger JA, et al. A phase 2 study of idelalisib plus rituximab in treatment-naïve older patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015 Dec 17;126(25):2686–94.
  86. Lampson BL, Kasar SN, Matos TR, Morgan EA, Rassenti L, Davids MS, et al. Idelalisib given front-line for treatment of chronic lymphocytic leukemia causes frequent immune-mediated hepatotoxicity. *Blood*. 2016 Jul 14;128(2):195–203.
  87. Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S, et al. Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jan 28;374(4):323–32.
  88. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jan 28;374(4):311–22.
  89. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2016 Jun;17(6):768–78.

## 10. Referencias

---

90. Fischer K, Al-Sawaf O, Fink A-M, Dixon M, Bahlo J, Warburton S, et al. Venetoclax and obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2017 May 11;129(19):2702–5.
91. Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, Jaksic B, Dmoszynska A, Wu J, et al. Alectuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Dec 10;25(35):5616–23.
92. Castro JE, Diaz-Perez JA, Barajas-Gamboa JS, Horton JM, Weidner N, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia associated with immunotactoid glomerulopathy: a case report of successful treatment with high-dose methylprednisolone in combination with rituximab followed by alectuzumab. *Leuk Lymphoma*. 2012 Sep;53(9):1835–8.
93. James DF, Werner L, Brown JR, Wierda WG, Barrientos JC, Castro JE, et al. Lenalidomide and rituximab for the initial treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter clinical-translational study from the chronic lymphocytic leukemia research consortium. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2014 Jul 1;32(19):2067–73.
94. Porter DL, Grupp SA, Kalos M, Loren AW, Lledo L, Gilmore J, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells Directed Against CD19 Induce Durable Responses and Transient Cytokine Release Syndrome in Relapsed, Refractory CLL and ALL. *ASH Annu Meet Abstr*. 2012 Nov 16;120(21):717.
95. Methot SP, Di Noia JM. Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Adv Immunol*. 2017;133:37–87.
96. 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 Sep 15;94(6):1840–7.
97. 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 Sep 15;94(6):1848–54.
98. Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Aug 15;100(4):1410–6.
99. 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 Aug 15;100(4):1177–84.
100. Parikh SA, Strati P, Tsang M, West CP, Shanafelt TD. Should IGHV status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2016 Apr 7;127(14):1752–60.
101. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primer*. 2017 19;3:16096.

- 
102. 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 Jan;21(1):1–3.
  103. Langerak AW, Davi F, Ghia P, Hadzidimitriou A, Murray F, Potter KN, et al. Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia*. 2011 Jun;25(6):979–84.
  104. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton L-A, Agathangelidis A, Baliakas P, et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia*. 2017 Jul;31(7):1477–81.
  105. Brown JR, Hallek MJ, Pagel JM. Chemoimmunotherapy Versus Targeted Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia: When, How Long, How Much, and in Which Combination? *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Meet*. 2016;35:e387-398.
  106. 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 Feb;31(2):245–8.
  107. Marinelli M, Ilari C, Xia Y, Del Giudice I, Cafforio L, Della Starza I, et al. Immunoglobulin gene rearrangements in Chinese and Italian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016 Apr 12;7(15):20520–31.
  108. 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 Feb 15;105(4):1678–85.
  109. Chen L, Zhang Y, Zheng W, Wu Y, Qiao C, Fan L, et al. Distinctive IgVH gene segments usage and mutation status in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2008 Oct;32(10):1491–8.
  110. Hojjat-Farsangi M, Jeddi-Tehrani M, Razavi SM, Sharifian RA, Mellstedt H, Shokri F, et al. Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage and mutational status of the leukemic B cells in Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Sci*. 2009 Dec;100(12):2346–53.
  111. Stanganelli C, Travella A, Bezares R, Slavutsky I. Immunoglobulin gene rearrangements and mutational status in argentinian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013 Aug;13(4):447–457.e2.
  112. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thörn I, Söderberg O, Hultdin M, et al. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):2262–4.
  113. Thorsélius M, Kröber A, Murray F, Thunberg U, Tobin G, Bühler 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 Apr 1;107(7):2889–94.

114. Karan-Djurasevic T, Palibrk V, Kostic T, Spasovski V, Nikcevic G, Srzentic S, et al. Mutational status and gene repertoire of IGHV-IGHD-IGHJ rearrangements in Serbian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012 Aug;12(4):252–60.
115. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Söderberg O, Karlsson K, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood.* 2003 Jun 15;101(12):4952–7.
116. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan X-J, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood.* 2012 May 10;119(19):4467–75.
117. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton L-A, Minga E, Agathangelidis A, Nichelatti M, et al. Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicentre study. *Lancet Haematol.* 2014 Nov;1(2):e74-84.
118. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol.* 2014 Mar;89(3):249–55.
119. Herling CD, Klaumünzer M, Rocha CK, Altmüller J, Thiele H, Bahlo J, et al. Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood.* 2016 Jul 21;128(3):395–404.
120. Baliakas P, Puiggros A, Xochelli A, Sutton L-A, Nguyen-Khac F, Gardiner A, et al. Additional trisomies amongst patients with chronic lymphocytic leukemia carrying trisomy 12: the accompanying chromosome makes a difference. *Haematologica.* 2016 Jul 1;101(7):e299–302.
121. Jaglowski SM, Ruppert AS, Heerema NA, Bingman A, Flynn JM, Grever MR, et al. Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2012 Oct;159(1):82–7.
122. 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. *Leukemia.* 2007 Dec;21(12):2442–51.
123. Rigolin GM, del Giudice I, Formigaro L, Saccenti E, Martinelli S, Cavallari M, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biologic correlations. *Genes Chromosomes Cancer.* 2015 Dec;54(12):818–26.
124. Dubuc AM, Davids MS, Pulluqi M, Pulluqi O, Hoang K, Hernandez-Sánchez JM, et al. FISHing in the dark: How the combination of FISH and conventional karyotyping improves the diagnostic yield in CpG-stimulated chronic lymphocytic leukemia:

- 
- Combined FISH and Karyotyping Improves Diagnostic Yield in CLL. *Am J Hematol.* 2016 Oct;91(10):978–83.
125. Heerema NA, Byrd JC, Dal Cin PS, Dell' Aquila ML, Koduru PRK, Aviram A, et al. Stimulation of chronic lymphocytic leukemia cells with CpG oligodeoxynucleotide gives consistent karyotypic results among laboratories: a CLL Research Consortium (CRC) Study. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010 Dec;203(2):134–40.
  126. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000 Dec 28;343(26):1910–6.
  127. 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. *Br J Haematol.* 2003 Apr;121(2):287–95.
  128. Geisler C, Jurlander J, Bullinger L, Sander S, Brown P, Benner A, et al. Danish CLL2-Study revisited: FISH on a cohort with a 20-yr follow-up confirms the validity of the hierarchical model of genomic aberrations in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol.* 2009 Aug;83(2):156–8.
  129. Van Dyke DL, Shanafelt TD, Call TG, Zent CS, Smoley SA, Rabe KG, et al. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2010 Feb;148(4):544–50.
  130. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell.* 2013 Feb 14;152(4):714–26.
  131. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature.* 2015 Oct 22;526(7574):525–30.
  132. Mosca L, Fabris S, Lionetti M, Todoerti K, Agnelli L, Morabito F, et al. Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010 Dec 1;16(23):5641–53.
  133. Parker H, Rose-Zerilli MJJ, Parker A, Chaplin T, Wade R, Gardiner A, et al. 13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2011 Mar;25(3):489–97.
  134. Puiggros A, Delgado J, Rodriguez-Vicente A, Collado R, Aventín A, Luño E, et al. Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *Br J Haematol.* 2013 Oct;163(1):47–54.
  135. Garg R, Wierda W, Ferrajoli A, Abruzzo L, Pierce S, Lerner S, et al. The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2012 Jul 15;118(14):3531–7.

## 10. Referencias

---

136. Chena C, Avalos JS, Bezares RF, Arrossagaray G, Turdó K, Bistmans A, et al. Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. *Eur J Haematol*. 2008 Aug;81(2):94–9.
137. Reddy KS. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol*. 2006 Mar;132(6):705–22.
138. Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, Deambrogi C, Bertoni F, Del Giudice I, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Aug;50(8):633–43.
139. Hernández JA, Rodríguez AE, González M, Benito R, Fontanillo C, Sandoval V, et al. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica*. 2009 Mar;94(3):364–71.
140. Van Dyke DL, Werner L, Rassenti LZ, Neuberg D, Ghia E, Heerema NA, et al. The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol*. 2016 Apr 5;173 (1):105–13.
141. Rodríguez AE, Hernández JÁ, Benito R, Gutiérrez NC, García JL, Hernández-Sánchez M, et al. Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia patients with a high number of losses in 13q14. *PloS One*. 2012;7(11):e48485.
142. Döhner 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 Apr 1;89(7):2516–22.
143. Neilson JR, Auer R, White D, Bienz N, Waters JJ, Whittaker JA, et al. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia*. 1997 Nov;11(11):1929–32.
144. Tsimberidou A-M, Tam C, Abruzzo LV, O'Brien S, Wierda WG, Lerner S, et al. Chemoimmunotherapy may overcome the adverse prognostic significance of 11q deletion in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2009 Jan 15;115(2):373–80.
145. Hernández JÁ, Hernández-Sánchez M, Rodríguez-Vicente AE, Grossmann V, Collado R, Heras C, et al. A Low Frequency of Losses in 11q Chromosome Is Associated with Better Outcome and Lower Rate of Genomic Mutations in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *PloS One*. 2015;10(11):e0143073.
146. Marasca R, Maffei R, Martinelli S, Fiorcari S, Bulgarelli J, Debbia G, et al. Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematol Oncol*. 2013 Jun;31(2):88–95.
147. Jain P, Keating M, Thompson PA, Trinh L, Wang X, Wierda W, et al. High fluorescence in situ hybridization percentage of deletion 11q in patients with chronic lymphocytic leukemia is an independent predictor of adverse outcome: del11q in CLL. *Am J Hematol*. 2015 Jun;90(6):471–7.

- 
148. Rossi D, Gaidano G. ATM and chronic lymphocytic leukemia: mutations, and not only deletions, matter. *Haematologica*. 2012 Jan;97(1):5–8.
  149. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol*. 1996 Feb;92(2):382–8.
  150. Sorigue M, Maluquer C, Junca J. Phenotypic characterization of trisomy 12 monoclonal B-cell lymphocytosis. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017 Feb 10;[Epub ahead of print].
  151. Gattei V, Bomben R, Dal Bo M, Zucchetto A, Rossi F, Degan M, et al. Lack of Prognostic Significance of the Conventional and Novel Prognostic Markers in Trisomy 12 Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood*. 2016;128:4354.
  152. Baumann T, Delgado J, Santacruz R, Martínez-Trillos A, Rozman M, Aymerich M, et al. CD49d (ITGA4) expression is a predictor of time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukaemia and mutated IGHV status. *Br J Haematol*. 2016 Jan;172(1):48–55.
  153. Kriston C, Bödör C, Szenthe K, Bánáti F, Bánkúti B, Csernus B, et al. Low CD23 expression correlates with high CD38 expression and the presence of trisomy 12 in CLL. *Hematol Oncol*. 2017 Mar;35(1):58–63.
  154. Ibbotson R, Athanasiadou A, Sutton L-A, Davis Z, Gardiner A, Baliakas P, et al. Coexistence of trisomies of chromosomes 12 and 19 in chronic lymphocytic leukemia occurs exclusively in the rare IgG-positive variant. *Leukemia*. 2012 Jan;26(1):170–2.
  155. Nguyen-Khac F, Chevret S, Roux C, Touzeau C, Cosson A, Cymbalista F, et al. Mutational and cytogenetic analyses of 177 CLL patients with trisomy 12: a retrospective study of the CLL french intergroup. *Blood*. 2013;122(21):4144–4144.
  156. Balatti V, Lerner S, Rizzotto L, Rassenti LZ, Bottoni A, Palamarchuk A, et al. Trisomy 12 CLLs progress through NOTCH1 mutations. *Leukemia*. 2013 Mar;27(3):740–3.
  157. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*. 2012 Jan 12;119(2):329–31.
  158. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavolaro S, Gabrielli S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*. 2012 Mar;97(3):437–41.
  159. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Jan;8(1):38–47.
  160. Ouillette P, Saiya-Cork K, Seymour E, Li C, Shedden K, Malek SN. Clonal evolution, genomic drivers, and effects of therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013 Jun 1;19(11):2893–904.

161. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009 Feb 1;15(3):995–1004.
162. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood.* 2008 Oct 15;112(8):3322–9.
163. Zenz T, Häbe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Bühler A, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood.* 2009 Sep 24;114(13):2589–97.
164. Quijano S, López A, Rasillo A, Sayagués JM, Barrena S, Sánchez ML, et al. Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008 May;74(3):139–49.
165. Döhner 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 Mar 15;85(6):1580–9.
166. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, Abruzzo LV, Van Dyke DL, O'Brien S, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood.* 2009 Jul 30;114(5):957–64.
167. Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A, Russo Rossi A, De Angeli C, Tiseo R, et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol.* 2008 Aug;142(4):529–37.
168. Davids MS, Vartanov A, Werner L, Neuberg D, Dal Cin P, Brown JR. Controversial fluorescence in situ hybridization cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia: new insights from a large cohort. *Br J Haematol.* 2015 Sep;170(5):694–703.
169. Cosson A, Chapiro E, Belhouachi N, Cung H-A, Keren B, Damm F, et al. 14q deletions are associated with trisomy 12, NOTCH1 mutations and unmutated IGHV genes in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014 Aug;53(8):657–66.
170. Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, Wildenberger K, Bentz M, Döhner K, et al. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 1999 Sep;13(9):1331–4.
171. Wang D-M, Miao K-R, Fan L, Qiu H-R, Fang C, Zhu D-X, et al. Intermediate prognosis of 6q deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2011 Feb;52(2):230–7.

- 
172. Sindelárová L, Michalová K, Zemanová Z, Ransdorfová S, Brezinová J, Peková S, et al. Incidence of chromosomal anomalies detected with FISH and their clinical correlations in B-chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 Jul 1;160(1):27–34.
  173. Chena C, Arrossagaray G, Scolnik M, Palacios MF, Slavutsky I. Interphase cytogenetic analysis in Argentinean B-cell chronic lymphocytic leukemia patients: association of trisomy 12 and del(13q14). *Cancer Genet Cytogenet.* 2003 Oct 15;146(2):154–60.
  174. Greipp PT, Smoley SA, Viswanatha DS, Frederick LS, Rabe KG, Sharma RG, et al. Patients with chronic lymphocytic leukaemia and clonal deletion of both 17p13.1 and 11q22.3 have a very poor prognosis. *Br J Haematol.* 2013 Nov;163(3):326–33.
  175. Puiggros A, Collado R, Calasanz MJ, Ortega M, Ruiz-Xivillé N, Rivas-Delgado A, et al. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. *Oncotarget.* 2017 Aug 15;8(33):54297–303.
  176. Travella A, Ripollés L, Aventin A, Rodríguez A, Bezares RF, Caballín MR, et al. Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *Cytogenetic and FISH analysis.* *Hematol Oncol.* 2013 Jun;31(2):79–87.
  177. Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, Ferrajoli A, Stingo F, Smith SC, et al. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer.* 2015 Oct 15;121(20):3612–21.
  178. Rigolin GM, Cavallari M, Quaglia FM, Formigaro L, Lista E, Urso A, et al. In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. *Blood.* 2017 Apr 26;129:3495–8.
  179. Kryachok I, Abramenko I, Bilous N, Chumak A, Martina Z, Filonenko I. IGHV gene rearrangements as outcome predictors for CLL patients: experience of Ukrainian group. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* 2012 Jun;29(2):1093–101.
  180. Wuilleme S, Robillard N, Lodé L, Magrangeas F, Beris H, Harousseau J-L, et al. Ploidy, as detected by fluorescence in situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia.* 2005 Feb;19(2):275–8.
  181. Moorman AV, Harrison CJ, Buck GAN, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood.* 2007 Apr 15;109(8):3189–97.
  182. DeNicola M, Pullarkat S, Yea S, Rao N, Yang L, Tirado CA. Hyperdiploidy in CLL/SLL: A Rare Cytogenetic Event Associated with Poor Prognosis. *J Assoc Genet Technol.* 2014;40(1):22–4.
  183. Vundinti BR, Korgaonkar S, Kerketta L, Ghosh K. A rare case of B-cell chronic lymphocytic leukemia with t(2;14)(p13;q32), +X, +11, +12, +13,+der(1p) karyotype. *Indian J Cancer.* 2011 Sep;48(3):387–8.

## 10. Referencias

---

184. Davis Z, Forconi F, Parker A, Gardiner A, Thomas P, Catovsky D, et al. The outcome of Chronic lymphocytic leukaemia patients with 97% IGHV gene identity to germline is distinct from cases with <97% identity and similar to those with 98% identity. *Br J Haematol.* 2016 Apr;173(1):127–36.
185. Crombie J, Davids MS. IGHV Mutational Status Testing in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am J Hematol.* 2017 Jun 7;[Epub ahead of print].
186. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood.* 2016 Jan 14;127(2):208–15.
187. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2016 Jan 21;127(3):303–9.
188. O'Brien S, Furman RR, Steven, E, Flinn IW, Burger J, Blum KA, et al. Five-Year Experience with Single-Agent Ibrutinib in Patients with Previously Untreated and Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Leukemia. *Blood.* Dec 02;128 (22):233.
189. Bomben R, Dal-Bo M, Benedetti D, Capello D, Forconi F, Marconi D, et al. Expression of mutated IGHV3-23 genes in chronic lymphocytic leukemia identifies a disease subset with peculiar clinical and biological features. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010 Jan 15;16(2):620–8.
190. Bomben R, Dal Bo M, 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 Apr 1;109(7):2989–98.
191. Donisi PM, Di Lorenzo N, 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 Am J Surg Pathol Part B.* 2006 Dec;15(4):206–15.
192. Gladstone DE, Swinnen L, Kasamon Y, Blackford A, Gocke CD, Griffin CA, et al. Importance of immunoglobulin heavy chain variable region mutational status in del(13q) chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2011 Oct;52(10):1873–81.
193. Gladstone DE, Blackford A, Cho E, Swinnen L, Kasamon Y, Gocke CD, et al. The importance of IGHV mutational status in del(11q) and del(17p) chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012 Apr;12(2):132–7.
194. Sandoval-Sus JD, Chavez JC, Dalia S, Naqvi SMH, Talati C, Nodzson L, et al. Association between immunoglobulin heavy-chain variable region mutational status and isolated favorable baseline genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2017 Jun 22;1–10.
195. Strati P, Abruzzo LV, Wierda WG, O'Brien S, Ferrajoli A, Keating MJ. Second Cancers and Richter Transformation Are the Leading Causes of Death in Patients With Trisomy 12 Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2015 Jul;15(7):420–7.

- 
196. Tam CS, Otero-Palacios J, Abruzzo LV, Jorgensen JL, Ferrajoli A, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia CD20 expression is dependent on the genetic subtype: a study of quantitative flow cytometry and fluorescent in-situ hybridization in 510 patients. *Br J Haematol*. 2008 Apr;141(1):36–40.
  197. Parikh SA, Rabe KG, Call TG, Zent CS, Habermann TM, Ding W, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort study of newly diagnosed patients. *Br J Haematol*. 2013 Sep;162(6):774–82.
  198. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Jun 1;29(16):2223–9.
  199. Watanabe A, Inokuchi K, Yamaguchi H, Mizuki T, Tanosaki S, Shimada T, et al. Near-triploidy and near-tetraploidy in hematological malignancies and mutation of the p53 gene. *Clin Lab Haematol*. 2004 Feb;26(1):25–30.



# 11 ANEXOS

Anexo A – Material suplementario del Capítulo 5 (Artículo 2).....	123
Anexo B – Material suplementario del Capítulo 6 (Artículo 3).....	125
Anexo C – Material suplementario del Capítulo 7 (Artículo 4).....	127



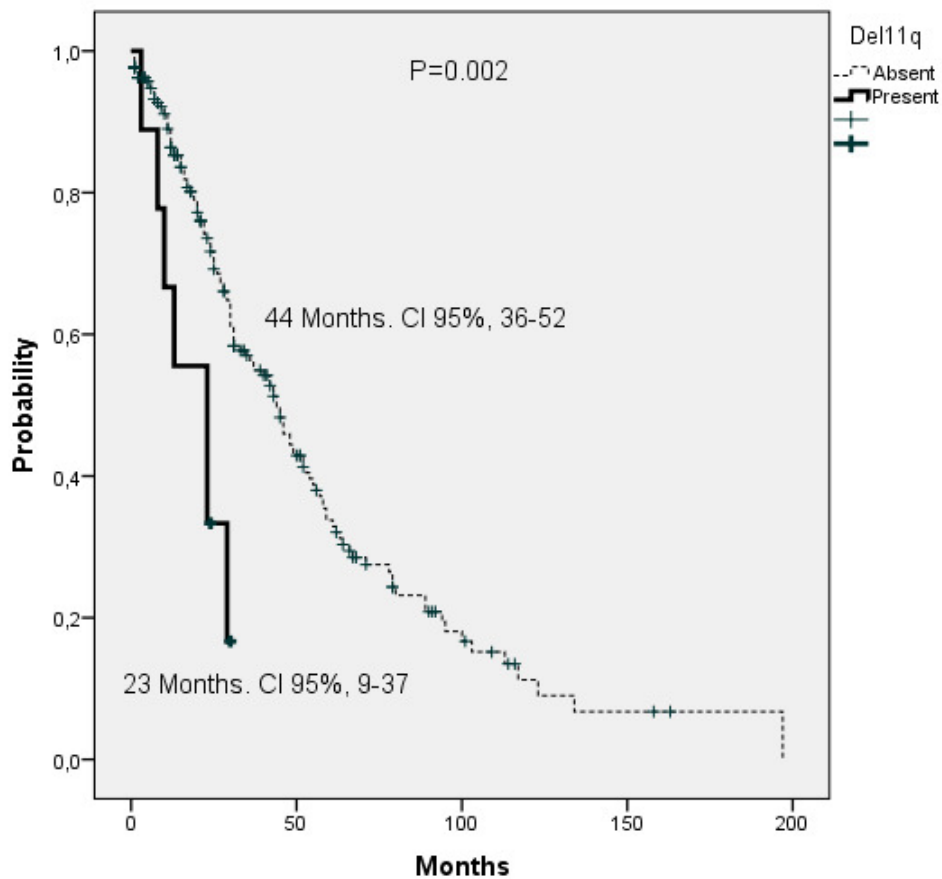
# ANEXO A – MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 5 (ARTÍCULO 2)

**Table S1.** Genomic aberrations assessed by FISH divided according to the percentage of cells carrying +12.

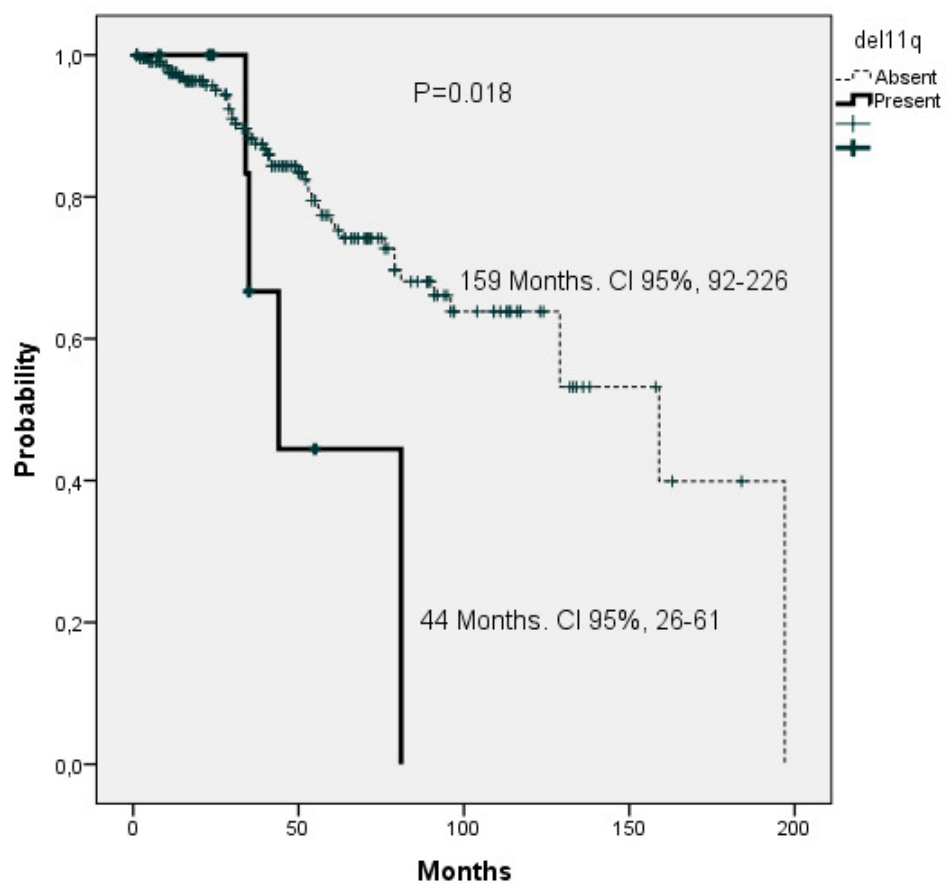
	FISH +12 <60% n=174	FISH +12 ≥60% n=115
<b>Total other FISH aberrations</b>	<b>34</b>	<b>22</b>
13q- (n=34)	17	17
17p- (n=11)	8	3
11q- (n=5)	4	1
11q- and 13q- (n=3)	3	0
17p- and 13q- (n=2)	2	0
17p- and 11q- (n=1)	0	1
<b>Only +12 (n=233)</b>	<b>140</b>	<b>93</b>

**Figure S1.** Kaplan-Meier curves for: time to first therapy (TTFT) in patients with +12 and 11q- (A); and overall survival (OS) in patients with +12 and 11q- (B).

**S1A**



S1B



## ANEXO B – MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 6 (ARTÍCULO 3)

**Table S1.** Number of cases with each combination of abnormalities belonging to the complex-FISH subgroup.

Complex-FISH combination	Number of cases
13q-, 11q- and 17p-	12
13q-, 17p- and +12	6
17q-, 11q- and +12	5
13p-, 11q- and +12	4
4 abnormalities	1

**Table S2.** Time to first therapy for each subgroup of MA when they occurred at diagnosis.

MA	Median TTFT (months)	95% CI	P value
13q - and +12	53	42-64	0.1
+12 and 17p-	36	9-63	
13q- and 11q-	27	12-41	
Complex-FISH	37	6-67	
13q- and 17p-	20	9-30	
11q- and 17p-	6	0-27	
+12 and 11q-	14	2-26	

**Table S3.** Overall survival for each subgroup of MA when they occurred at diagnosis.

MA	Median OS (months)	95% CI	P value
13q - and +12	not reached	not reached	
+12 and 17p-	not reached	not reached	
13q- and 11q-	not reached	not reached	
Complex-FISH	41	27-54	0.01
13q- and 17p-	37	0-80	
11q- and 17p-	43	25-60	
+12 and 11q-	62	42-82	



## ANEXO C – MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 7 (ARTÍCULO 4)

*Table S1. Univariate log rank analysis. A. Time to first therapy (TTFT). B. Overall Survival (OS).*

S1A

Variable		Median TTFT (months)	95%CI	P value
Hyperdiploidy	Yes	1	0.1-1.8	0.003
	No	53	53-73	
Sex	Male	59	47-71	0.3
	Female	75	53-97	
B symptoms	Absent	73	56-89	<0.001
	Present	2	1-26	
Lactate dehydrogenase	Normal	74	57-90	<0.001
	High	9	5-13	
$\beta_2$ microglobulin	Normal	106	84-127	<0.001
	High	32	20-44	
Binet stage	A	94	72-116	<0.001
	B	7	4-10	
	C	1	0.3-2	
Rai stage	0	121	88-154	<0.001
	1	27	19-34	
	2	8	3-13	
	3	1	0.3-2	
	4	1	0.1-2	
Lymphadenopathy	$\leq 3$ areas	91	69-112	<0.001
	$> 3$ areas	5	2-8	
Splenomegaly	Absent	83	61-104	<0.001
	Present	6	0.9-11	
Hepatomegaly	Yes	11	0.1-21	<0.001
	No	67	54-80	
IGHV mutation status	Yes	182	102-261	<0.001
	No	31	24-38	
17p-	Present	10	1.5-18	<0.001
	Absent	66	54-78	

## S1B

Variable		Median OS (months)	95%CI	P value
<b>Hyperdiploidy</b>	<b>Yes</b>	66	0-174	0.018
	<b>No</b>	147	124-269	
<b>B symptoms</b>	<b>Absent</b>	162	122-202	<0.001
	<b>Present</b>	64	47-80	
<b>Lactate dehydrogenase</b>	<b>Normal</b>	173	136-210	<0.001
	<b>High</b>	74	61-87	
<b>β<sub>2</sub>microglobulin</b>	<b>Normal</b>	239	46-331	<0.001
	<b>High</b>	94	68-120	
<b>Binet stage</b>	<b>A</b>	195	155-235	<0.001
	<b>B</b>	77	51-103	
	<b>C</b>	40	19-70	
<b>Rai stage</b>	<b>0</b>	275	138-412	<0.001
	<b>1</b>	120	97-141	
	<b>2</b>	77	71-82	
	<b>3</b>	51	21-80	
	<b>4</b>	36	6-66	
<b>Lymphadenopathy</b>	<b>≤ 3 areas</b>	195	140-249	<0.001
	<b>&gt; 3 areas</b>	76	65-87	
<b>Splenomegaly</b>	<b>Absent</b>	173	140-206	<0.001
	<b>Present</b>	75	63-87	
<b>Hepatomegaly</b>	<b>Yes</b>	126	80-172	p=0.005
	<b>No</b>	147	123-171	
<b>IGHV mutation status</b>	<b>Yes</b>	239	129-348	<0.001
	<b>No</b>	123	97-148	
<b>17p-</b>	<b>Present</b>	51	33-69	<0.001
	<b>Absent</b>	157	125-189	

**Table S2. Multivariate Cox regression analysis. S2A. Time to first therapy (TTFT). S2B. Overall Survival(OS).**

**S2A**

<b>Variable</b>	<b>Hazard ratio</b>	<b>95%CI</b>	<b>P value</b>
<b>Hyperdiploidy</b>	2.5	0.5-11.2	0.2
<b>Mutational status</b>	3.3	2.2-5.1	<0.001
<b>17p-</b>	1.7	0.8-3.8	0.1
<b>Advanced Binet stage</b>	1.5	0.7-3.09	0.2
<b>Advanced Rai stage</b>	1.5	1.1-2.2	0.007
<b>Absence B symthoms</b>	0.2	0.1-0.4	<0.001
<b>Hepatomegaly</b>	4.7	2.2-10	<0.001
<b>Splenomegaly</b>	1.2	0.3-1.08	0.2
<b>&gt;3 lymph node areas</b>	2.0	1.1-3.7	0.02
<b>High <math>\beta_2</math>microglobulin</b>	1.2	0.7-1.8	0.4
<b>High LDH</b>	0.9	0.5-1.7	0.8

**S2B**

<b>Variable</b>	<b>Hazard ratio</b>	<b>95%CI</b>	<b>P value</b>
<b>Hyperdiploidy</b>	0.3	0.07-1.8	0.2
<b>Mutational status</b>	2.6	1.4-5	0.002
<b>17p-</b>	5.6	2.4-12	<0.001
<b>Advanced Binet stage</b>	0.4	0.1-1.2	0.1
<b>Advanced Rai stage</b>	1.8	1.1-2.8	0.012
<b>B symthoms</b>	1.0	0.3-3.4	0.8
<b>Hepatomegaly</b>	3.0	0.9-9.4	0.05
<b>Splenomegaly</b>	0.7	0.2-2.0	0.5
<b>&gt;3 lymph node areas</b>	2	0.8-4.7	0.1
<b>High <math>\beta_2</math>microglobulin</b>	1.9	1.0-3.6	0.03
<b>High LDH</b>	1.6	0.7-3.7	0.2

