

**ESTUDIO DE FACTORES PRONOSTICO EN UNA SERIE DE
PACIENTES CON LEUCEMIA LINFATICA CRONICA:
DESARROLLO DE UN NOMOGRAMA E INDICE PRONOSTICO.**

Tesis doctoral

Ana Dolores González Serna

INDICE

1. INTRODUCCION.....	15
2. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA B.....	19
2.1. Sistema linfoide. Conceptos generales.....	19
2.2. Ontogenia de los linfocitos B.....	20
2.3. Maduración del linfocito B en el ganglio linfático.....	24
2.4. Etiopatogenia y biología de la leucemia linfática crónica B.....	25
2.4.1. Hipótesis proliferativa.....	27
2.4.1.1. El linfocito B normal.....	27
2.4.1.2. Factores inductores en la LLC-B.....	28
2.4.1.3. Factores promotores en la LLC-B.....	30
2.4.1.3.1. El receptor de la célula B.....	30
2.4.1.3.2. Otros factores promotores.....	31
2.4.1.4. Crecimiento y evolución de las células de la LLC-B.....	32
2.4.1.5. Desarrollo de la LLC-B a partir de un linfocito B normal.....	32
2.4.2. Resistencia a la apoptosis.....	35
2.4.2.1. Vía intrínseca o mitocondrial.....	36
2.4.2.2. Apoptosis mediada por receptores (vía extrínseca).....	37
2.4.3. Inmunodeficiencia. Anomalías en la interacción de las células T y los linfocitos B neoplásicos.....	38
2.4.4. Angiogénesis.....	39
2.5. Hallazgos biológicos con valor pronóstico en la leucemia linfática crónica B...	40
2.5.1. Factores clásicos: estadiaje clínico, tiempo de doblaje linfocitario, patrón de infiltración en la biopsia ósea, $\beta 2$ microglobulina.....	40
2.5.2. Enzima timidin-kinasa.....	41
2.5.3. Estudios inmunofenotípicos.....	42
2.5.3.1. <i>Score</i> inmunofenotípico.....	42
2.5.3.2. Antígeno de superficie CD38.....	42
2.5.3.3. Proteína ZAP70.....	43
2.5.4. Alteraciones citogenéticas.....	45
2.5.5. Estado mutacional de las cadenas pesadas de los genes de las inmunoglobulinas.....	47
2.6. Linfocitosis B monoclonal de significado incierto.....	49
2.7. Índice pronóstico en leucemia linfática crónica B.....	51
2.8. Tratamiento.....	54
2.8.1. Tratamiento quimioterápico.....	55
2.8.2. Inmunoterapia.....	56
2.8.3. Químio-inmunoterapia.....	57
2.8.4. Trasplante de médula ósea.....	58

3. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	61
4. MATERIAL Y METODOS.....	65
4.1. Sujetos del estudio.....	66
4.1.1. Datos clínicos relacionados con los pacientes.....	66
4.1.2. Datos biológicos relacionados con los pacientes.....	66
4.2. Estudio inmunofenotípico.....	67
4.3. Protocolo de recogida de datos.....	67
4.4. Análisis estadístico.....	70
4.4.1. Análisis univariante.....	70
4.4.2. Análisis multivariante.....	70
5. RESULTADOS.....	73
5.1. Características generales de los sujetos incluidos en el estudio.....	75
5.1.1. Análisis descriptivo de las variables cualitativas.....	75
5.1.2. Análisis descriptivo de las variables cuantitativas.....	86
5.2. Factores pronósticos de supervivencia.....	97
5.2.1. Características clínico biológicas.....	98
5.2.2. Características histopatológicas.....	105
5.2.3. Características inmunofenotípicas.....	106
5.2.4. Características citogenéticas.....	106
5.2.5. Tratamiento.....	109
5.3. Antígeno de superficie CD38.....	112
5.3.1. Expresión del antígeno de superficie CD38 y variables clínico-biológicas.....	112
5.3.2. Expresión del antígeno de superficie CD38 y patrón de infiltración en la biopsia ósea.....	115
5.3.3. Expresión del antígeno de superficie CD38 y estudio inmunofenotípico.....	116
5.3.4. Expresión del antígeno de superficie CD38 y estudio citogenético.....	117
5.3.5. Expresión del antígeno de superficie CD38 y tratamiento.....	119
5.3.6. Expresión del antígeno de superficie CD38 y supervivencia.....	121
5.4. Proteína ZAP70.....	122
5.4.1. Expresión de la proteína ZAP70 y variables clínico-biológicas.....	122
5.4.2. Expresión de la proteína ZAP70 y patrón de infiltración en la biopsia ósea.....	123
5.4.3. Expresión de la proteína ZAP70 y estudio inmunofenotípico.....	123
5.4.4. Expresión de la proteína ZAP70 y estudio citogenético.....	123
5.4.5. Expresión de la proteína ZAP70 y tratamiento.....	124
5.4.6. Expresión de la proteína ZAP70 y supervivencia.....	125
5.5. Linfocitosis monoclonal B de significado incierto en nuestra población.....	125
5.6. Nomograma e índice pronóstico en nuestra población.....	128

6. DISCUSION.....	141
6.1. Factores pronóstico en la leucemia linfática crónica B.....	143
6.1.1. Características clínico-biológicas.....	146
6.1.2. Características histopatológicas.....	148
6.1.3. Características inmunofenóticas.....	148
6.1.4. Características citogenéticas.....	149
6.1.5. Tratamiento.....	150
6.2. Antígeno de superficie CD38.....	153
6.2.1. Características clínico-biológicas.....	155
6.2.2. Características histopatológicas.....	155
6.2.3. Características inmunofenóticas.....	155
6.2.4. Características citogenéticas.....	156
6.2.5. Tratamiento.....	158
6.2.6. Supervivencia.....	158
6.3. Linfocitosis monoclonal B de significado incierto en nuestra población.....	159
6.4. Nomograma y estratificación pronóstica.....	161
7. CONCLUSIONES.....	169
8. BIBLIOGRAFIA.....	173
9. PUBLICACIONES.....	195

I- Abreviaturas

Ac: anticuerpo.

AcMo: anticuerpo monoclonal.

Add 14: adicción del cromosoma 14.

Ag: antígeno.

Alb: albúmina.

Alo-PHSP: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica.

β 2M: β 2-microglobulina.

BD: bilirrubina directa.

B.O.: biopsia ósea.

BT: bilirrubina total.

Ca: calcio sérico.

CC: citogenética convencional.

Cf: ciclofosfamida.

Cr: creatinina.

CVP: ciclofosfamida + vincristina + prednisona.

EMA: antígeno epitelial de membrana.

Del 6q: deleción del brazo largo del cromosoma 6.

Del 7q: deleción del brazo largo del cromosoma 7.

Del 9q: deleción del brazo largo del cromosoma 9.

Del 11q22.3-q23.1: deleción del brazo largo del cromosoma 11.

Del 17p: deleción del brazo corto del cromosoma 17.

Del 13q14: deleción del brazo largo del cromosoma 13.

FA: fosfatasa alcalina.

FC: fludarabina + ciclofosfamida.

FISH: técnicas de hibridación in situ con fluorescencia.

FMC: fludarabina + mitroxantrone + ciclofosfamida.

GPT: alanino aminotransferasa.

Hb: hemoglobina.

I: intersticial.

IF: inmunofenotipo.

Igs: inmunoglobulinas.

IgVH: cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.

IL: interleukina.
LDH: lactato deshidrogenada.
LLC-B: leucemia linfática crónica de línea B.
LTc: células T citotóxicas.
LTh: células T cooperadoras.
LTs: células T supresoras.
Neg: negativo.
N-I: nódulo-intersticial.
NK: células *natural killer*.
PCR: proteína C reactiva.
PHSP: progenitores hematopoyéticos de sangre periférica.
Pos: positivo.
PT: proteínas totales.
RCB: receptor de la célula B.
RCT: receptores de la célula T.
SIg: inmunoglobulina de superficie.
TASPE: trasplante autólogo de progenitores de sangre periférica.
TCD: test de Coombs directo
TDL: tiempo de doblaje linfocitario.
TNF: factor de necrosis tumoral.
Tpo: tiempo.
Tto: tratamiento.
VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial.
VSG: velocidad de sedimentación.
+12: trisomía 12.
2-CDA: Cladribina.

II- Tablas

Etiopatogenia y biología de la leucemia linfática crónica B.

Tabla 1. Comparación de la visión histórica y actual de la LLC.

Índice pronóstico en la leucemia linfática crónica B.

Tabla 2. Propuesta de estratificación en grupos de riesgo según factores pronóstico (Montserrat E. Haematologica, 2.001).

Tabla 3. Propuesta de estratificación en grupos de riesgo según factores pronóstico. Protocolo GCLLSG7/FCLLSG (Hallek M., Haematologica 2003).

Tabla 4. Propuesta de estratificación en grupos de riesgo según factores pronóstico. Protocolo Clínica Mayo (Kay NE. y Shanafelt T., Curr Hematol Malig Rep.2.007).

Tabla 5. Índice pronóstico basado en la presencia de factores de riesgo propuesto por Wierda W. y cols (Blood 2.007).

Características generales de la cohorte de sujetos incluidos en nuestra serie.

Tabla 6. Características generales de la cohorte de sujetos incluidos en nuestra serie.

Tabla 7. Identificación de 2 subgrupos en función de la expresión de CD38 en la población de nuestro estudio.

Tabla 8. Identificación de 2 subgrupos en función de la expresión de ZAP70 en la población de nuestro estudio.

Tabla 9. Alteraciones cromosómicas por orden de frecuencia determinadas por FISH en nuestra serie.

Tabla 10. Tratamiento recibido en la población de nuestro estudio.

Tabla 11. Análisis descriptivo de las variables cuantitativas.

Factores pronóstico de supervivencia. Comparación de las características entre pacientes vivos y fallecidos.

Tabla 12. Supervivencia en función de la presencia de adenopatías.

Tabla 13. Supervivencia en función de la esplenomegalia.

Tabla 14. Supervivencia en función de la hepatomegalia.

Tabla 15. Supervivencia en función del estadio clínico Rai.

Tabla 16. Supervivencia en función del estadio clínico Binet.

Tabla 17. Supervivencia en función de la cifra de β 2-microglobulina.

Tabla 18. Supervivencia en función del TCD.

Tabla 19. Supervivencia en función de TDL.

Tabla 20. Comparación de variables cuantitativas entre ambos grupos.

Tabla 21 y 22. Supervivencia en función del patrón de infiltración en la biopsia ósea.

Tabla 23. Alteraciones cromosómicas por grupos de riesgo citogenético en nuestra serie.

Tabla 24. Comparación de la citogenética convencional entre ambos grupos.

Tabla 25. Supervivencia en función de las alteraciones cromosómicas por grupos de riesgo.

Tabla 26. Supervivencia en función del tratamiento.

Tabla 27. Comparación del nº de líneas de tratamiento y tiempo transcurrido hasta el inicio del primer tratamiento entre el grupo de pacientes vivos y el de fallecidos.

Tabla 28. Supervivencia en función de los 4 grupos de tratamiento.

Antígeno de superficie CD38.

Tabla 29. Comparación de la presencia de adenopatías en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 30. Comparación de la presencia de esplenomegalia en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 31. Comparación de la presencia de hepatomegalia en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 32. Comparación del estadio clínico (Rai) en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 33. Comparación del estadio clínico (Binet) en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 34. Comparación del nivel de β 2-microglobulina en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 35. Comparación de variables cuantitativas en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 36 y 37. Comparación del patrón de infiltración en la B.O. en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 38 y 39. Comparación del *score* inmunofenotípico en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 40. Comparación de anomalías cromosómicas por CC en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 41. Comparación de anomalías cromosómicas por FISH en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 42. Comparación de las distintas alteraciones cromosómicas (FISH) en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 43. Comparación de los grupos de riesgo CC y/o FISH en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 44. Comparación de los grupos de evolución clonal en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 45. Comparación de la necesidad de tratamiento en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 46. Comparación de los distintos tipos de tratamiento en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 47. Comparación del nº de meses desde el diagnóstico hasta el primer tratamiento en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 48. Comparación del nº de meses de seguimiento en función de la expresión del Ag CD38.

Tabla 49. Comparación del estatus vital en función de la expresión del Ag CD38.

Proteína ZAP70.

Tabla 50. Comparación de anomalías cromosómicas por FISH en función de la expresión de ZAP70.

Tabla 51. Comparación de la delección 17p en función de la expresión de ZAP70.

Tabla 52. Comparación de grupos de riesgo CC y/o FISH en función de la expresión de ZAP70.

Linfocitosis monoclonal B de significado incierto.

Tabla 53. Características de los sujetos incluidos en el análisis.

Nomograma e índice pronóstico en nuestra población.

Tabla 54. Características de las variables cualitativas de los sujetos incluidos en el análisis.

Tabla 55. Características de las variables cuantitativas de los sujetos incluidos en el análisis.

Tabla 56. Desarrollo del nomograma: variables incluidas en el análisis univariante.

Tabla 57. Desarrollo del nomograma: variables incluidas en el análisis multivariante.

Tabla 58. Índice pronóstico basado en la presencia de los 5 factores de riesgo en nuestra serie.

Tabla 59. Supervivencia global y riesgo relativo de muerte en función de los 3 grupos de riesgo resultantes de nuestro IP.

Tabla 60. Resumen de los resultados de la comparación de nuestro IP y el IP del MDACC con la estadificación pronóstica de RAI.

Discusión

Tabla 58. Índice pronóstico basado en la presencia de los 5 factores de riesgo en nuestra serie.

Tabla 59. Supervivencia global y riesgo relativo de muerte en función de los 3 grupos de riesgo resultantes de nuestro IP.

III- Figuras

Etiopatogenia y biología de la leucemia linfática crónica B.

Figura 1. Estructura del folículo linfoide secundario (Chiorazzi N. y cols, The New England Journal of Medicine, 2.005).

Figura 2. Diagrama esquemático del reordenamiento y la transcripción de los genes de las IgVH (Chiorazzi N. y cols, The New England Journal of Medicine, 2.005).

Figura 3. Evolución de la célula B tras contacto antigénico (Stevenson F. y cols; Blood, 2.005).

Figura 4. Comparación de las vías de la maduración de la célula B (Chiorazzi N. y cols; The New England Journal of Medicine, 2.005).

Figura 5. Modelo del desarrollo y evolución de la célula de la LLC-B (Chiorazzi N. y cols, The New England Journal of Medicine, 2.005).

Hallazgos biológicos con valor pronostico en la leucemia linfatica cronica B.

Figura 6. Relación entre la expresión de ZAP70, estado mutacional de IgVH y tiempo entre diagnóstico y el primer tratamiento (Crespo M. y cols, The New England Journal of Medicine 2.003).

Figura 7. Correlación entre la expresión de ZAP70 y supervivencia en LLC (Crespo M. y cols, The New England Journal of Medicine 2.003).

Figura 8. Alteraciones cromosómicas y supervivencia (Döhner H. y cols, The New England Journal of Medicine 2.000).

Figura 9. Relación entre citogenética, estado mutacional de IgVH y supervivencia (Krober A. y cols, Blood 2.002).

Figura 10. Estado mutacional de los genes de las cadenas pesadas de las IgVH y supervivencia (Hamblin TJ. y cols, Blood 2.002).

Figura 11. Diferencias fundamentales en la LLC según las mutaciones de los genes IgVH (Shanafelt Tait D. et al, Blood, 2.004).

Índice pronóstico en la leucemia linfática crónica B.

Figura 12. Nomograma propuesto por Wierda W. et al (Blood 2007).

Características generales de los sujetos incluidos en el estudio.

Figura 13. Distribución por sexo.

Figura 14. Distribución por edad.

Figura 15. Distribución por adenopatías.

Figura 16. Distribución por esplenomegalia.

Figura 17. Distribución por hepatomegalia.

Figura 18. Distribución por estadio según la clasificación de Rai.

Figura 19. Distribución por estadio según la clasificación de Binet.

Figura 20. Distribución por β 2-microglobulina.

Figura 21. Distribución por Test de Coombs directo.

Figura 22. Distribución por características del proteinograma.

Figura 23. Distribución por score inmunofenotípico.

Figura 24. Distribución por la expresión del antígeno CD38.

Figura 25. Distribución por la expresión de la proteína ZAP70.

Figura 26. Distribución por el patrón de biopsia ósea.

Figura 27. Distribución por evolución clonal.

Figura 28. Distribución en función del tratamiento.

Figura 29. Distribución por estatus vital.

Figura 30. Histograma de edades.

Figura 31. Histograma de hemoglobina.

Figura 32. Histograma de leucocitos.

Figura 33. Histograma de neutrófilos.

Figura 34. Histograma de linfocitos.

Figura 35. Histograma de monocitos.

Figura 36. Histograma de eosinófilos.
Figura 37. Histograma de plaquetas.
Figura 38. Histograma de creatinina.
Figura 39. Histograma de ácido úrico.
Figura 40. Histograma de calcio.
Figura 41. Histograma de BT.
Figura 42. Histograma de BD.
Figura 43. Histograma de GPT.
Figura 44. Histograma de LDH.
Figura 45. Histograma de FA.
Figura 46. Histograma de proteínas totales.
Figura 47. Histograma de albúmina.
Figura 48. Histograma de IgG.
Figura 49. Histograma de IgA.
Figura 50. Histograma de IgM.
Figura 51. Histograma de β 2-microglobulina.
Figura 52. Histograma de VSG.
Figura 53. Histograma de PCR.
Figura 54. Histograma de TDL.
Figura 55. Histograma de linfocitos patológicos.
Figura 56. Histograma de nº de meses de seguimiento.
Figura 57. Histograma de número de meses desde el diagnóstico al primer tratamiento.
Figura 58. Histograma de número de líneas de tratamiento.

Factores pronóstico de supervivencia.

Figura 59. Supervivencia acumulada en nuestra población.
Figura 60. Supervivencia por grupos de edad.
Figura 61. Supervivencia en función de la presencia de adenopatías.
Figura 62. Supervivencia en función de la esplenomegalia.
Figura 63. Supervivencia en función de la hepatomegalia.
Figura 64. Supervivencia en función del estadio clínico Rai.
Figura 65. Supervivencia en función del estadio clínico Binet.
Figura 66. Supervivencia en función de la cifra de β 2-microglobulina.
Figura 67. Supervivencia en función del TCD.
Figura 68. Supervivencia en función del TDL.

Figura 69. Supervivencia en función del patrón de infiltración en la biopsia ósea.

Figura 70. Supervivencia en función del *score* inmunofenotípico.

Figura 71. Supervivencia en función de los hallazgos del estudio FISH.

Figura 72. Supervivencia en función de las alteraciones cromosómicas por grupos de riesgo.

Figura 73. Supervivencia en función de la evolución clonal.

Figura 74. Supervivencia en función del tratamiento.

Figura 75. Supervivencia en función de los 4 grupos de tratamiento.

Antígeno de superficie CD38.

Figura 76. Supervivencia global en función de la expresión del Ag CD38.

Linfocitosis monoclonal B de significado incierto.

Figura 77. Tiempo hasta la duplicación linfocitaria en función del recuento linfocitario mayor o menor a 10.000 (/ μ L).

Figura 78. Tiempo hasta el primer tratamiento en función del recuento linfocitario mayor o menor a 10.000 (/ μ L).

Figura 79. Tiempo al primer tratamiento en los pacientes con menos de 10.000 linfocitos en función de la expresión de CD38 al diagnóstico.

Nomograma e índice pronóstico en nuestra población.

Figura 80. Supervivencia acumulada en nuestra serie de pacientes.

Figura 81. Supervivencia en función de los grupos de edad.

Figura 82. Supervivencia en función de estadio Rai modificado.

Figura 83. Supervivencia en función de la expresión de CD38/ZAP70.

Figura 84. Supervivencia en función de los grupos de riesgo por CC y/o FISH.

Figura 85. Supervivencia en función de la cifra de linfocitos estratificada (<20.000, 20-50.000 y >50.000/ μ L).

Figura 86. Supervivencia global de nuestra serie a los 5 años.

Figura 87. Supervivencia estimada en función de los 3 grupos de riesgo resultantes de nuestro IP (kaplan- Meier).

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION.

La leucemia linfática crónica de línea B (LLC-B) es una enfermedad cuyo curso clínico es altamente variable; mientras unos pacientes presentan una evolución indolente sin necesidad de tratamiento, en otros se manifiesta como una entidad agresiva requiriendo terapia desde el mismo momento del diagnóstico. Por este motivo, numerosos estudios se han centrado en la identificación de los factores que influyen de manera mas relevante en el curso clínico de esta entidad, con el objetivo final de poder trazar un plan de seguimiento clínico y, eventualmente, terapéutico adaptado al riesgo individual de cada paciente.

La existencia de subgrupos con distinto pronóstico ya se había puesto de manifiesto con los estudios clásicos en relación a la presentación clínica (Rai KR., 1.975; Binet JL. y cols, 1.977), el tiempo de duplicación linfocitario (Montserrat E. y cols, 1.986) y el patrón de infiltración óseo (Rozman C. y cols, 1.981 y 1.984a). Sin embargo, es a mediados de los noventa, cuando empiezan a llegar avances más notables en el conocimiento de la biología de la enfermedad con la identificación de nuevos factores pronóstico: el perfil de expresión del antígeno de superficie CD38 y la proteína ZAP70, determinadas alteraciones citogenéticas analizadas mediante técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) y el estado mutacional de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Así, a finales de la decada de los noventa se demostró que el antígeno de superficie CD38 era un marcador pronóstico independiente, cuya expresión se relacionaba con supervivencias global y libre de tratamiento más cortas. Con posterioridad y gracias al desarrollo y estandarización de las técnicas de citometría de flujo, la expresión de la proteína ZAP-70 por parte de las células leucémicas también demostró tener valor pronóstico independiente, con las ventajas adicionales que, a diferencia de CD38, su expresión no sufría variaciones a lo largo del curso de la enfermedad y tenía además una buena correlación con el estado mutacional de los genes de las inmunoglobulinas. Por otro lado, la aplicación de técnicas de FISH ha mejorado el rendimiento de la citogenética convencional en el estudio de alteraciones concretas, elevando la detección de alteraciones cromosómicas hasta alrededor del 80% de los casos, y además ha puesto de manifiesto que las alteraciones más frecuentes (del13q, del11q, +12 y del17p) tienen implicación pronóstica. Los anteriores hallazgos, sin embargo no menoscaban el papel fundamental del estudio citogenético mediante cariotipo, que es imprescindible tanto para la detección de anomalías recurrentes de menor frecuencia o cariotipos complejos como para la detección de evolución clonal en el curso de la enfermedad. Finalmente, diversos estudios mediante técnicas de biología molecular han tenido una repercusión relevante en este campo. De manera particular los trabajos de Damle y Hamblin demostraron en 1.999 que, aproximadamente en el 50% de los pacientes, los

linfocitos neoplásicos presentaban mutaciones de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgVH). Este hallazgo implicaba la existencia de 2 formas distintas de LLC-B en relación a su origen ontogénico: una forma pre-germinal y otra post-germinal con pronóstico diferente, siendo peor en la forma pre-germinal (no mutada).

Además de los progresos en el conocimiento de la biología de la LLC-B en la última década se han producido considerables avances en el tratamiento de esta entidad. En este sentido, parece evidente que la estratificación de los pacientes va a ser crucial para ajustar la intensidad de los nuevos tratamientos al pronóstico de los pacientes (Montillo M. y cols, 2.005). Por ello es muy importante la identificación de factores con valor pronóstico que permitan estimar con mayor exactitud el curso evolutivo de la enfermedad y el tiempo de supervivencia desde el momento del diagnóstico, y cuya integración posibilite la creación de algoritmos de actuación terapéutica. En este sentido, varios grupos han desarrollado con mayor o menor fortuna índices pronóstico o sistemas de puntuación semejantes al IPI (Índice Pronóstico Internacional) en los linfomas no Hodgkin o FLIPI en los linfomas foliculares, destacando entre ellos el nomograma e índice pronóstico descrito por Wierda y colaboradores del M.D. Anderson Cancer Center en el año 2.007.

Hasta hace escasos años, los avances antes mencionados no habían tenido un reflejo proporcional en el esfuerzo diagnóstico que se efectuaba en una fracción relevante de pacientes. Ello tiene varias explicaciones: en primer lugar por tratarse de pacientes mayoritariamente añosos con una expectativa de vida limitada en base a la media de la población general; en segundo lugar la LLC-B sigue percibiéndose tanto por los médicos generales, como -sorprendentemente- por muchos hematólogos como una enfermedad “que no mata”; en tercer lugar, muchas de las nuevas técnicas biológicas no están al alcance de la mayoría de centros, esto conlleva que su determinación implique el envío de las muestras a laboratorios de referencia con las molestias que ello ocasiona, lo que desanima en muchas ocasiones a su solicitud; en cuarto lugar estas pruebas son costosas, lo que en nuestro medio y circunstancias puede llevar a cuestionar su relación coste/ beneficio. A consecuencia de todo ello, el diagnóstico del conjunto de los pacientes con LLC-B seguía presentando una apreciable falta de homogeneidad lo que, a efectos prácticos tenía su implicación en el seguimiento y la actitud terapéutica. Afortunadamente, los últimos años han sido testigos de transformaciones relevantes en el manejo de estos pacientes, que ahora ha pasado a basarse tanto en la edad y comorbilidades, como en factores biológicos con valor pronóstico, siendo el más fiel reflejo de este cambio la Guía Americana NCCN.

En base a lo anteriormente expuesto, el objetivo de esta Tesis Doctoral es determinar cuáles son los parámetros biológicos a nuestra disposición que permiten la mejor estratificación de los

pacientes con LLC-B y en función de ello desarrollar un nuevo índice pronóstico adaptado al riesgo de nuestra serie.

2. LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B.

2.1. SISTEMA LINFOIDE. CONCEPTOS GENERALES.

Los linfocitos representan uno de los componentes básicos de la defensa del organismo frente a agresiones externas y, gracias a su plasticidad genética, son los principales responsables de la respuesta inmune. Estas células se encuentran en grandes cantidades en la sangre, linfa y órganos linfoides (timo, ganglios linfáticos y bazo). Este grupo de células se puede dividir en linfocitos T, responsables de la inmunidad celular, los linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral y células *natural killer* (NK) que representan los elementos filogenéticamente más primitivos responsables de la inmunidad no antígeno (Ag) específica.

Dentro de los linfocitos T hay tres grandes grupos de células: las células T cooperadoras (LTh), que ayudan a que las células B produzcan una respuesta humoral, las células T supresoras (LTs) que modulan la respuesta de las células B y las células T citotóxicas (LTc). Las células NK corresponden a linfocitos grandes granulares de la sangre periférica. Estas células tienen la capacidad innata de lisar diferentes variedades de células tumorales, células infectadas por virus y algunas células normales, sin sensibilización previa.

Se denominan “órganos linfoides primarios” a aquellos en los que los linfocitos se originan a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes y en el adulto corresponden a la médula ósea. Los linfocitos generados en los órganos linfoides primarios son vírgenes (células que no han entrado en contacto con un antígeno). En el resto de órganos linfoides del adulto (ganglio linfático, bazo y sistema linfático asociado a mucosas y piel) se generan linfocitos antígeno-específicos. Estos órganos linfoides en los que ocurre este proceso reciben el nombre de “órganos linfoides secundarios”.

Desde los tres meses de vida fetal, aparecen en los órganos linfoides secundarios acumulaciones esferoidales de linfocitos pequeños y células reticulares que se denominan folículos primarios. En la vida postnatal si estas células son activadas por un antígeno, se transforman en células linfoides grandes de carácter blástico que se acumulan en el centro del folículo. Esta estructura se denomina folículo secundario. En este tipo de folículos, se distinguen una zona periférica – manto folicular – integrado por linfocitos pequeños, y una zona central – centro germinal – caracterizado por la presencia de células de aspecto blástico. Dentro del centro germinal se distinguen dos zonas: una zona “clara” constituida a su vez por una zona clara basal y una zona

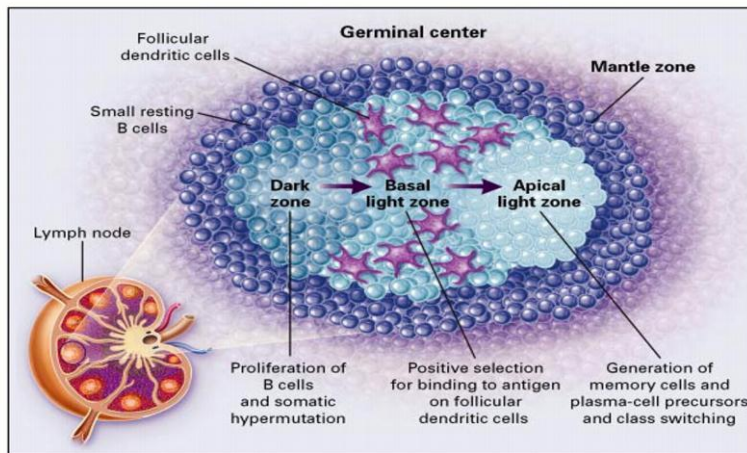
clara apical ocupada mayoritariamente por centrocitos y una zona “oscura” con predominio de centroblastos. En algunos órganos linfoides, como el bazo, los ganglios mesentéricos y las placas de Peyer del intestino, puede existir una capa celular por fuera del manto que lo rodea que se denomina “zona marginal”. Esta capa está integrada por células linfoides de tamaño intermedio y citoplasma claro. En estos folículos secundarios se encuentran, además, células dendríticas foliculares, macrófagos y algún linfocito T. Los folículos se hallan rodeados de linfocitos T que se disponen en forma difusa y constituyen la zona paracortical o zona T. Esta zona contiene muchas células interdigitantes, que expresan valores muy elevados de antígenos de superficie del sistema de histocompatibilidad de clase II. El folículo linfoide constituye la unidad funcional fundamental de la zona B.

2.2. ONTOGENIA DE LOS LINFOCITOS B.

Los linfocitos B derivan de una célula germinal linfoide pluripotente y adquieren su competencia inmunológica en la médula ósea. Presentan en la membrana unas moléculas de carácter proteico, responsables del reconocimiento antigénico característico de la inmunidad específica y que se denominan *receptores* del antígeno. Este tipo de moléculas pueden ser de dos tipos, inmunoglobulinas (Igs) y receptores de la célula T (RCT) que definen los subtipos celulares linfoides, B y T, respectivamente. Estas moléculas actúan como receptores específicos de los diferentes antígenos que circulan por el organismo y, aunque todas las células humanas tienen la dotación genética necesaria para la síntesis de tales proteínas, ésta solo se expresa en las células linfoides.

Son siete los genes que codifican la información necesaria para sintetizar estas moléculas, localizados en diferentes *loci* cromosómicos. En estos genes se pueden distinguir varias regiones genéticas, denominadas V (variable), D (diversidad), J (unión) y C (constante), constituidas a su vez por segmentos genómicos que son responsables de la síntesis de cada una de las partes proteicas de las moléculas receptoras. La gran diversidad proteica se genera con estos siete genes, gracias a que cada linfocito B y T reordena sus segmentos genéticos de una manera única y diferente a la de los demás. La probabilidad de que dos células lleven a cabo el mismo reordenamiento es prácticamente nula, y por lo tanto supone una base teórica muy fiable para poder distinguir unos linfocitos de otros. En todas las neoplasias linfoides, las células tienen el mismo patrón de reordenamiento de alguno o varios de los genes de los receptores antigénicos, constituyendo lo que se denomina una población clonal.

Fig1. Estructura del folículo linfoide secundario (Chiorazzi N. y cols, The New England Journal of Medicine, 2.005).



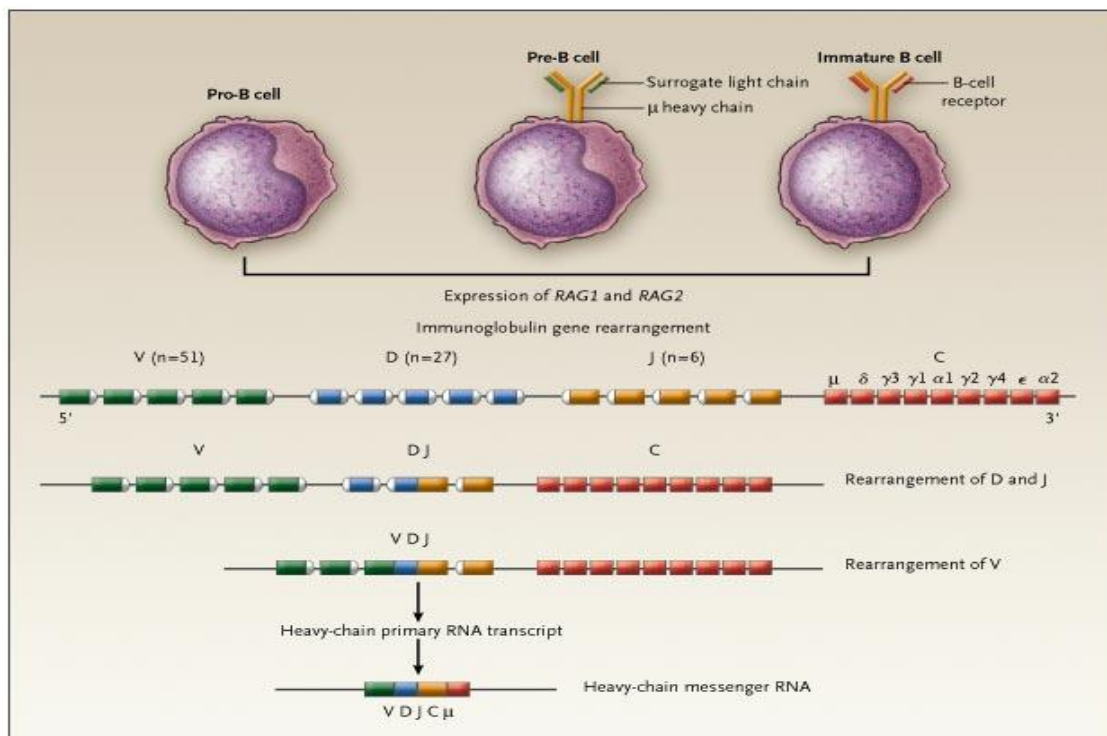
En la diferenciación linfocito B, el reordenamiento de la cadena pesada precede al de las cadenas ligeras. El primer reordenamiento que se produce es la unión de DJ_H , seguido de la unión de un segmento V_H al reordenamiento DJ_H . Este reordenamiento se inicia en un estadio muy precoz de la diferenciación B (célula pro-B), y ya está completo en la célula pre-B. Posteriormente se produce el reordenamiento de la cadena ligera κ . Si es funcional la célula expresará un receptor antigénico funcional (Ig M/ $D\kappa$) en la superficie, presente ya en los linfocitos inmaduros. Si el reordenamiento no fuera productivo comenzaría el reordenamiento de la cadena ligera λ , expresando en la superficie una molécula de Ig completa λ . Si este reordenamiento tampoco fuera productivo, la célula entraría en apoptosis. En los linfocitos B ocurre un segundo reordenamiento, correspondiente al proceso de cambio de isotipo de cadena pesada de la inmunoglobulina.

Los precursores más inmaduros de la célula B, denominados linfoblastos pro-B, ya pueden ser identificados fenotípicamente mediante anticuerpos monoclonales. Estas células expresan la molécula CD34, los antígenos HLA-DR, CD10, CD19, CD24 y la enzima TdT. No poseen inmunoglobulinas de superficie, pero sí reordenamiento del gen de la cadena pesada μ que representa la primera manifestación de compromiso con la línea B, como hemos indicado anteriormente.

En el estadio del linfocito pre-B existe todavía TdT y los antígenos CD10 y CD34. Además, expresan los antígenos HLA-DR, CD19, CD24 y aparecen el CD20 y CD22. La célula precursora B también expresa CD79a, molécula que se asocia con las Igs de superficie y está implicada en la transducción de señales tras la unión de las Igs de superficie con el Ag. En cuanto a la expresión de inmunoglobulinas, este estadio es el primero en el que pueden identificarse cadenas pesadas μ en el

interior del citoplasma, en ausencia de cadenas ligeras y de inmunoglobulinas de membrana. A medida que la maduración progresa, se pierde el CD10, se reordenan los genes de las cadenas ligeras que se transcriben, y se sintetizan y ensamblan con las cadenas μ . La célula pasa a expresar IgM de superficie, denominándose linfocito B inmaduro. Después pasa a linfocito B maduro que sintetiza además IgD y sigue expresando los antígenos denominados panleucocitarios y B (CD19, CD20, CD22, CD24, CD79b y otros).

Fig2. Diagrama esquemático del reordenamiento y la transcripción de los genes de las IgVH (Chiorazzi N. y cols, The New England Journal of Medicine, 2.005).



Los linfocitos B maduros pasan de la médula ósea a la sangre periférica, donde constituyen la minoría de la población linfocitaria circulante (entre un 5-15%). Posteriormente se dirigen hacia las áreas específicas en los órganos linfáticos periféricos. En sangre periférica existe una subpoblación de linfocitos B que se caracteriza por expresar la molécula CD5, que es un antígeno expresado fuertemente en los linfocitos T maduros, y constituyen entre el 10 y el 30% de los linfocitos B de sangre periférica. También se encuentran en el cordón umbilical, pleura, peritoneo y órganos linfoides secundarios siendo rara su presencia en médula ósea. Con la edad esta población disminuye. Estas son las células que están expandidas clonalmente en la leucemia linfática crónica.

En el ganglio, una vez que los linfocitos B son activados por antígenos, maduran a células formadoras de anticuerpos y a estadios maduros de célula plasmática, o evolucionan a células de memoria. Las células B maduras que no reciben el estímulo antigénico, o células vírgenes, pasan a formar parte de una fracción de células B de los folículos primarios y de la zona del manto; son células que tienen reordenados los genes de las inmunoglobulinas, pero no han sufrido el proceso de hipermutación somática, y están en reposo hasta que son estimuladas por un antígeno dando lugar a células blásticas que constituyen el centro germinal. Estas proliferan y se transforman en centroblastos, que no expresan, o lo hacen débilmente, inmunoglobulinas; éstos a su vez dan lugar a los centrocitos, que vuelven a expresar inmunoglobulinas de superficie. Los centrocitos, una vez estimulados por antígenos, se activan y abandonan los folículos secundarios como células de memoria o como precursores de las células plasmáticas. La mayoría de estos precursores de la célula plasmática, al abandonar el centro germinal, migran a la médula ósea para diferenciarse en célula plasmática madura y una minoría sufre la transformación a célula plasmática de alta afinidad para el Ag en el mismo folículo.

En resumen, durante la maduración del linfocito tienen lugar una secuencia de reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas (V, D y J). Dicha maduración puede ocurrir de dos maneras:

- Fase T-independiente (que tiene lugar de manera predominante en las llamadas “zonas T” en los ganglios linfáticos, en la zona paracortical, también en médula ósea y timo). En esta fase, el linfocito B se pone en contacto con el Ag sin la colaboración del linfocito T y da lugar a células plasmáticas que producen Ac de baja afinidad. A la vez ocurre el reordenamiento de los segmentos V, D y J.
- Fase T-dependiente (que tiene lugar de forma predominante en los folículos linfoides) en la cual en presencia de Ag y LTh el linfocito se activa en la zona extrafolicular, y/o bien se diferencia y madura hacia célula plasmática productora de Ac de alta afinidad por el Ag o bien migra a los folículos formando centros germinales. En estos centros tiene lugar la hipermutación somática de las regiones VDJ de las inmunoglobulinas (modulación de la afinidad) y la generación de la memoria de los linfocitos B.

2.3. MADURACIÓN DEL LINFOCITO B EN EL GANGLIO LINFÁTICO.

El linfocito pequeño B es una célula con escaso citoplasma, y núcleo redondo con cromatina condensada dispuesta en grumos gruesos y con nucleolo no aparente. Constituye la población celular predominante del folículo primario y del manto folicular de los folículos secundarios.

El linfocito B maduro virgen pre-germinal expresa los antígenos CD19, CD20, CD21, CD23, CD79a/b y la inmunoglobulina de superficie IgD. En los folículos primarios fetales, los linfocitos B también expresan los antígenos CD5 y CD10. En el adulto, un pequeño porcentaje de linfocitos, en este estadio, expresan CD5 y CD43 de manera débil, pero no el antígeno CD10. De estas células CD5+ pueden existir 2 subpoblaciones: CD23+ y CD23-.

Los linfocitos pequeños B de los mantos foliculares no expresan en su citoplasma cadenas ligeras de Ig, pero sí pueden expresar la proteína bcl-2 (proteína relacionada con la inhibición de apoptosis). En el núcleo de estas células no se observa expresión del antígeno Ki67 (proteína nuclear relacionada con la entrada en el ciclo celular) ni de la proteína bcl-6 necesaria en la formación de los centros germinales.

El centroblasto es una célula grande y de citoplasma escaso. El núcleo es redondeado, no hendido y ocupa la mayor parte de la célula. La cromatina está adosada a la cubierta nuclear al igual que los nucleolos. Constituye, junto con los centrocitos, la población predominante en los centros germinales de los folículos secundarios. El centroblasto se origina a partir de los linfocitos pequeños B del manto folicular. Además de CD79a, esta célula expresa en su superficie los antígenos CD20 y CD10, sin embargo no expresa CD23, CD21, CD5 ni IgD. En su núcleo expresan bcl-6, y en un elevado porcentaje, el antígeno Ki67. En el citoplasma no se detecta expresión de cadenas ligeras de Ig ni de la proteína bcl-2. El centroblasto es el elemento proliferativo de la extirpe B en el centro germinal y tiene por función multiplicar el número de células que, durante la respuesta primaria tardía y la respuesta secundaria, van a responder a un antígeno.

El centrocito es una célula pequeña ovalada de tamaño intermedio y de citoplasma escaso. El núcleo es ovalado de contornos irregulares, frecuentemente con una hendidura que lo hace característico, posee una cromatina de textura fina y homogénea y carece de nucleolos aparentes. Expresan en su superficie los antígenos CD20, CD79a/b y CD10 y en su núcleo expresan la proteína bcl-6. Ocasionalmente pueden expresar en el núcleo el antígeno Ki67, pero en menor porcentaje que los centroblastos.

La célula plasmática es una célula ovalada de tamaño intermedio-grande con citoplasma amplio y basófilo, con una zona paranuclear más clara. El núcleo es redondo y excéntrico, y en él,

la cromatina se dispone en acúmulos periféricos con un aspecto característico “en rueda de carro”. Constituyen una población minoritaria del centro germinal, puesto que sus precursores tienden a migrar fuera del mismo para diferenciarse en la médula ósea. Estas células pueden originarse a partir de diversos precursores de tipo B, entre ellos el centrocito y la célula de la zona marginal. La célula plasmocitoide es probable que corresponda a una de las formas morfológicas intermedias en este proceso de transición. Las células plasmáticas y plasmocitoides constituyen el elemento final en el proceso de diferenciación de los linfocitos B del centro germinal, y se especializan en la producción de anticuerpos de alta afinidad (existen células plasmáticas de otros orígenes que pueden producir anticuerpos no tan selectivos). De las células de extirpe B, las células plasmáticas se distinguen porque expresan CD28 y PCA-1. CD28 se encuentra en las células plasmáticas normales y en células mielomatosas. Expresan en su citoplasma el antígeno CD79a, cadenas ligeras de Ig y bcl-2, y en superficie los antígenos CD138, CD38 (en una densidad superior a la de cualquier otra célula hematopoyética) y altos niveles de CD43 y CD85. También pueden expresar CD30 y el antígeno EMA (antígeno epitelial de membrana).

2.4. ETIOPATOGENIA Y BIOLOGÍA DE LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B.

En los últimos años, la visión de las características biológicas clásicamente adscritas a la LLC-B ha cambiado. Inicialmente se asumió que las células de la enfermedad derivaban de linfocitos B inmaduros inmunológicamente incompetentes y que tenían una conducta inerte. Posteriormente aparecieron otras hipótesis que sugirieron que estas células derivaban de linfocitos maduros, inmunológicamente competentes y que presentan daños genéticos que implican alteraciones en la apoptosis, explicando así que la LLC-B sea una enfermedad acumulativa (Caligaris-Cappio F. y cols, 1.999). Recientes avances han demostrado que la estimulación antigénica, mediando factores inductores y promotores, puede originar la expansión clonal y determinar el curso clínico de la enfermedad, sin implicar alteraciones en las vías de la apoptosis (Ferrarini M. y Chiorazzi N., 2.004; Chiorazzi N. y cols, 2.005).

En la etiopatogenia de la LLC-B también se ha implicado la existencia de un estado de inmunodeficiencia adquirida en el que tendrían un papel clave las anomalías en la interacción de las células T y los linfocitos B neoplásicos (William G. y cols, 1.999; Thomas J. y cols, 2.000); y las alteraciones en la angiogénesis (Molica S. y cols, 2.002; Kini AR. y cols, 2.000).

En la siguiente tabla se refleja la evolución sobre el conocimiento de la LLC, desde la visión más clásica hasta las teorías más actuales.

Tabla 1. Comparación de la visión histórica y actual de la LLC.

Visión histórica	Visión actual (últimos 10 años)
Enfermedad clínicamente heterogénea con un origen celular homogéneo.	Enfermedad clínicamente heterogénea que se origina de linfocitos B que pueden diferir en activación, maduración, estado o subgrupo celular.
Derivada de linfocitos B vírgenes.	Derivada de linfocitos B antígeno experimentados que difieren en el nivel de mutaciones de IgVH
Acumulación de células leucémicas por defectos en la apoptosis	Acumulación de células leucémicas debida a una señal del micro-ambiente sobre un subgrupo de células leucémicas a través de una variedad de receptores y ligandos.
Enfermedad de acumulación	Enfermedad de acumulación con un alto nivel de proliferación previamente no reconocido
Marcadores pronóstico permiten estratificar pacientes pero no el curso clínico de la enfermedad.	Nuevos marcadores moleculares y proteínas identifican pacientes con diferente riesgo lo que permite distinguir el curso clínico de la enfermedad.
Terapia basada en la clínica.	Nuevas evidencias biológicas proporcionan la base para el desarrollo de agentes terapéuticos efectivos.

A continuación vamos a describir dos de las hipótesis más aceptadas que existen en la actualidad con los respectivos mecanismos que determinan la expansión clonal y la influencia que ejercen sobre el curso clínico de la enfermedad de estos pacientes.

2.4.1. Hipótesis proliferativa.

Como hemos comentado previamente trabajos recientes han demostrado que las propiedades celulares y la estimulación antigénica pueden dictar el tipo de expansión clonal y determinar el curso clínico de esta enfermedad, sin producir alteraciones en la apoptosis como hasta ahora se había creído, sino alterando la proliferación celular mediante diversos factores inductores y promotores, los cuales mencionaremos en apartados posteriores (Ferrarini M. y Chiorazzi N., 2.004; Chiorazzi N. y cols, 2.005).

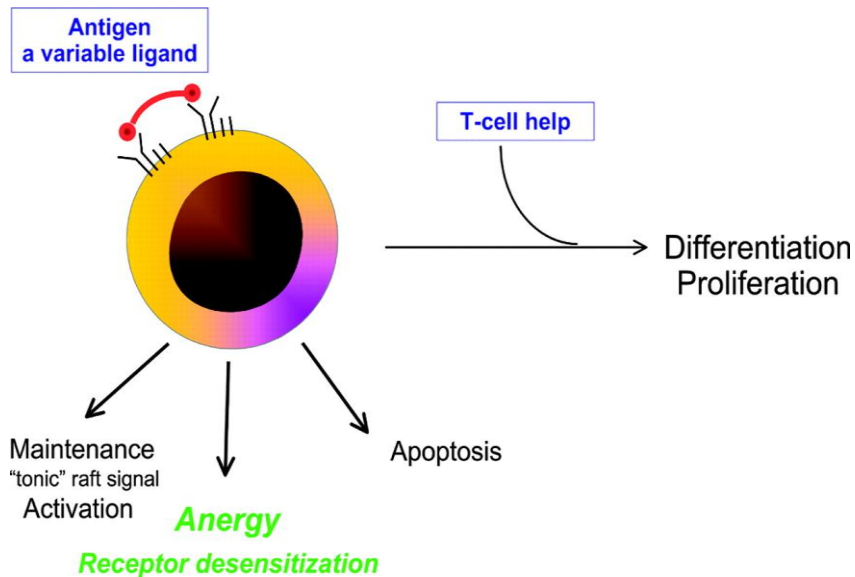
2.4.1.1. El linfocito B normal.

El linfocito B adquiere competencia inmunológica en la médula ósea. En su membrana presentan unas moléculas de carácter proteico, resultado de un reordenamiento genómico. Estas proteínas (Igs) sirven como receptor de la célula B (RCB). Como hemos comentado en un apartado anterior, la probabilidad de que dos células lleven a cabo el mismo reordenamiento es prácticamente nula, y por lo tanto supone una base teórica muy fiable para poder distinguir unos linfocitos de otros.

Cuando un antígeno de adecuada afinidad se une al receptor, la célula entra en el centro germinal del folículo linfoide donde, como centroblasto, es rápidamente dividida y los genes de la fracción variable de las Igs son sometidos a hipermutación somática. En este proceso se producen mutaciones de los genes de $V_H DJ_H$ y $V_L J_L$ que codifican el lugar de unión del receptor. A través de esas mutaciones, el receptor de las células desencadenantes, llamadas centrocitos, adquieren nuevas propiedades con el fin de aumentar su afinidad. Cuando la unión entre un Ag y el RCB es afín se produce una proliferación celular mientras que cuando no es así, la célula es eliminada.

La estimulación de la célula B normalmente requiere la ayuda de los linfocitos T. Esto ocurre en el centro germinal. Sin embargo, el proceso puede proceder sin células T y fuera del centro germinal, en la zona marginal de los folículos linfoides en respuesta a carbohidratos de bacterias encapsuladas y virus. Ambos mecanismos permiten el desarrollo de células plasmáticas o células B memoria (Figura 3).

Fig3. Evolución de la célula B tras contacto antigénico (Stevenson F. y cols; Blood, 2.005).



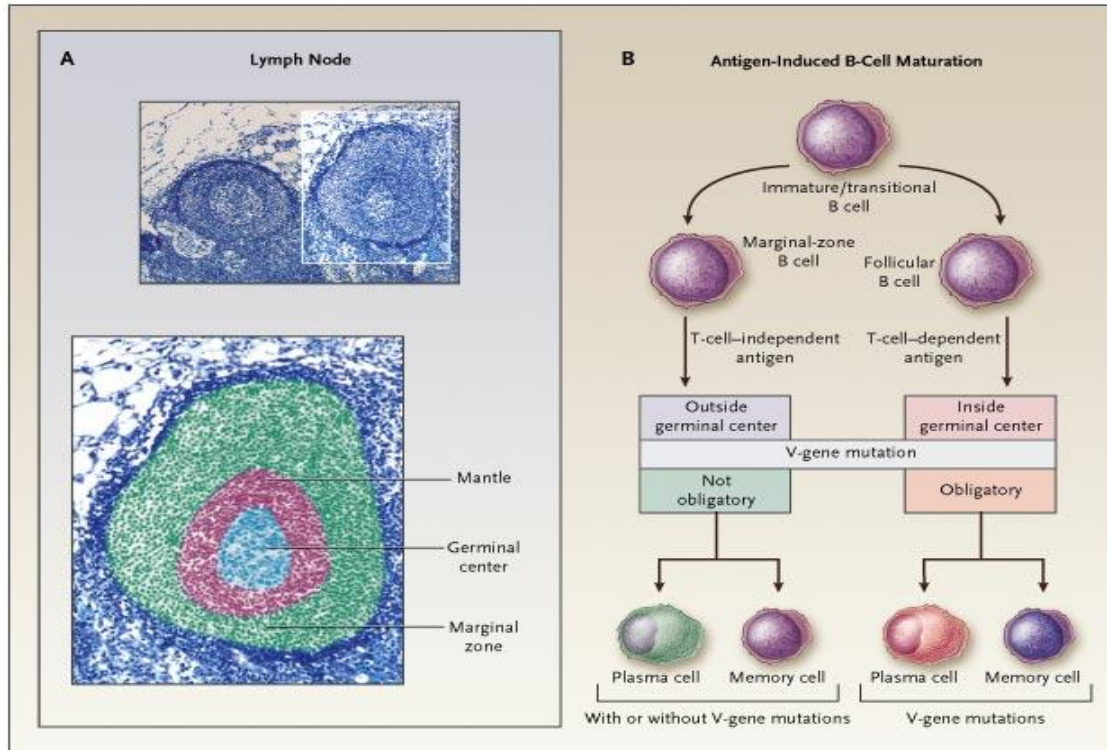
A la vez que ocurre la activación de la célula B, las proteínas de la membrana de la célula cambian. Esto ayuda a la célula B a interactuar con otras células y mediadores solubles, y así la célula se incrementa en número, o bien madura a célula plasmática productora de Ac. Una de las moléculas de superficie que está implicada en la interacción y diferenciación de la célula B es el Ag CD38, que ante ciertas circunstancias aumenta la señal de los receptores de la célula B y manda señales que regulan la apoptosis de la misma.

Las señales recibidas a través del RCB son transferidas al núcleo por una cascada de moléculas que interactúan y cuya estructura es modificada temporalmente durante el proceso. Estas modificaciones implican la unión de un grupo fosfato a tirosinas mediante enzimas específicas. Las enzimas implicadas son miembros de la familia Src de proteínas tirosin-kinasa. Para los linfocitos T, la proteína tirosin-kinasa ZAP-70 es crucial con una actividad similar.

2.4.1.2. Factores inductores en LLC.

Las translocaciones cromosómicas que comprometen a oncogenes frecuentemente causan linfomas B. Sin embargo la LLC-B es un caso especial porque estas translocaciones son raras y todavía no ha sido identificada una mutación específica. Sin embargo, la naturaleza monoclonal de los linfocitos B que proliferan en esta enfermedad implica que deben existir lesiones en el clon progenitor aunque aún no están definidas.

Fig4. Comparación de las vías de maduración de la célula B (Chiorazzi N. y cols; The New England Journal of Medicine, 2.005).



Las alteraciones citogenéticas son raras en el clon leucémico al inicio de la enfermedad y por lo tanto es probable que no sean factores inductores. Sin embargo algunas aparecen cuando la enfermedad progresa. La lesión citogenética más común es una deleción en 13q14.3, que ocurre en más del 50% de los casos. Esta región delecionada cuenta con 2 genes micro-RNA. Estos son fabricados normalmente por células, incluidos los linfocitos B y regulan la función de muchos genes, algunos de los cuales pueden tener relevancia en el cáncer y en particular en la LLC-B. Ambos genes micro-RNA son suprimidos o regulados en la mayoría de los casos. La presencia de esta deleción podría conferir a la clona leucémica una ventaja selectiva por predisponer a mutaciones adicionales.

Las alteraciones citogenéticas con peor pronóstico son las deleciones en 11q22-23, 17p13 y 6q21 (Döhner H. y cols, 2.000). Aunque los genes que están implicados en estas lesiones son desconocidos, se conoce que p53 está relacionado con la deleción de 17p13 y el gen ATM (ataxia-telangiectasia) con la deleción 11q22-23. Ambos genes están implicados en la regulación de la

apoptosis y su alteración conferiría resistencia a la quimioterapia. Estas deleciones son relativamente frecuentes en casos no mutados de LLC con mal pronóstico.

El gen TCL-1, localizado en 14q32.1 e implicado en la patogenia de la leucemia prolinfocítica de células T, también se expresa en la leucemia linfática crónica. En ratones, este gen ha sido sobreexpresado mediante manipulación genética desarrollando una leucemia o un linfoma de células CD5+ que recuerdan a la leucemia linfática crónica. Aunque TCL-1 es un atractivo candidato como factor inductor, alteraciones de éste o su regulación todavía no han sido identificadas en pacientes con LLC.

2.4.1.3. Factores promotores en LLC.

En los últimos años, nuevas evidencias sugieren que la estimulación antigénica, junto con la interacción con células accesorias y citoquinas, son un factor promotor que estimula la proliferación de la célula de la LLC-B y permite evitar la apoptosis. Estos efectos promotores pueden diferir en los distintos subgrupos de LLC-B y nos permiten entender la disparidad en los resultados clínicos.

2.4.1.3.1. El receptor de la célula B.

Diversos estudios sugieren que la LLC-B se origina en linfocitos B específicos que expresan un repertorio restringido de receptores de célula B (RCB). Además, aunque no existe una explicación precisa, se presupone que la expansión clonal es apoyada por señales del microambiente a la célula a través de este RCB. Estos receptores son estructuralmente muy similares, por lo tanto los Ag que tienen afinidad por éstos, también son similares y relevantes en la patogenia de la enfermedad. La anomalía desencadenante podría ser una estimulación repetida de antígenos. Estos Ag promotores son desconocidos, pero es probable que sean virus latentes o bacterias, es decir se postula que la LLC-B podría resultar, directa o indirectamente de infecciones específicas de manera similar a lo que ocurre en los Linfomas gástricos con el *Helicobacter pylori*. Alternativamente, antígenos del medio ambiente o auto-Ag también podrían conducir a una expansión clonal. Este mecanismo es admisible para las formas no mutadas y algunos casos de formas mutadas; es decir que ambos subgrupos derivan de células con experiencia antigénica a diferencia de lo que se pensaba hasta ahora, de que los linfocitos de la LLC-B derivaban de células vírgenes en las formas no mutadas y de células memoria en las formas mutadas.

El RCB es la “clave” que determina la conducta de la célula B y es inusual que se una a un solo ligando. Los niveles de unión al RCB también varían, siendo modulados por la valencia

antigénica y la densidad y la organización del epítoto. Por otro lado, el umbral requerido para que se produzca una transmisión efectiva también difiere de acuerdo al estado de diferenciación celular, de manera que las células vírgenes requieren una mayor concentración de antígeno que las células memoria para iniciar la respuesta. En realidad, la forma de unión al RCB puede determinar si la respuesta es T Independiente o requiere de estas células T. Cuando éstas intervienen, la proliferación y diferenciación pueden suceder. Si no es así, ocurre apoptosis o anergia (experiencia antigénica previa).

Para generar expansión, la unión Ag-RCB debe originar una transducción eficiente hacia el núcleo. En las formas no mutadas, la unión del Ag al RCB IgM puede iniciar la transducción. En las formas mutadas, la estimulación del RCB puede ser menos eficiente o no ocurrir por:

- Incapacidad innata
- Anergia.
- Cambios en la estructura del RCB causadas por mutaciones somáticas o por incapacidad de las células para establecer contacto con el Ag.
- Reducción del número de moléculas RCB,
- Desacoplamiento del RCB con moléculas accesorias necesarias para la transducción efectiva.
- Mutaciones en tales moléculas accesorias.

Una vez iniciada la transducción, los linfocitos B progresan en el ciclo celular o entran en apoptosis. La estimulación de un RCB IgM puede originar señales pro o antiapoptóticas, mientras que si es IgD invariablemente es antiapoptótica.

El balance final de todos los estímulos recibidos probablemente determine el crecimiento del clon maligno in vivo, por lo tanto el tipo de crecimiento de una proporción de casos de LLC-B es un modelo dinámico donde las células activadas por una señal a través del RCB son predisuestas a proliferar o a la apoptosis.

2.4.1.3.2. Otros factores promotores.

También han sido implicadas en la estimulación antigénica, células de contacto o factores solubles que posiblemente propaguen el crecimiento de las células leucémicas. Así, las señales producidas por CD38 e IL-2 inducen proliferación y prolongan la supervivencia de una subpoblación de células de LLC-B. Este antígeno CD38 funciona como un receptor en las células leucémicas asociado con el complejo RCB/ CD19. Un trabajo realizado por Deaglio S. y cols, en el año 2.005, ha demostrado que la unión de CD38 con su ligando CD31 forma parte de una red de comunicación entre células neoplásicas y células no neoplásicas. Además, la interacción CD38/

CD31 permite que se incremente la proliferación de células leucémicas mediante una cooperación directa con CD100, un receptor de superficie miembro de la familia de las semaforinas que interactúa con CD72 y con plexina-B1 (ligando expresado por células endoteliales y estromales). Por lo tanto, la expresión de estos marcadores representa un elemento desfavorable en la evolución de la enfermedad. Por último en este estudio, se ha objetivado un significativo incremento de las células de la LLC-B CD38+/ CD100+ que interactúan con las células “*nurse-like*”. Estos resultados proporcionan la primera evidencia de interacción entre CD38 y CD100 en la LLC-B y de CD31 y plexina-B1 en el estroma.

Por otro lado, las células T u otras células que expresen CD40 apoyan el crecimiento de las células de la LLC-B al igual que las citoquinas como la IL-4, IL-8, IL-13, IL-15 y el VEGF; quimocinas como SDF-1 o genes antiapoptóticos como bcl-2, survivina y Mcl-1. Por lo tanto, el crecimiento del clon dependería de una variedad de interacciones con el medio ambiente que pueden ser responsables del cambio del curso clínico.

Este crecimiento también puede variar en los diferentes compartimentos del organismo. Por ejemplo, la proliferación celular puede estar aumentada en los pseudofolículos, estructura detectada en la médula ósea y nódulos linfoides de pacientes con LLC-B. Los pseudofolículos aparentemente tienen la función de facilitar el encuentro entre la célula maligna y las diferentes células accesorias. Por el contrario, la proliferación puede ser difícil en la sangre periférica debido a la ausencia de interacciones celulares. Por lo tanto, las células estromales y células nurse-like tienen una función activa y están relacionadas con los casos de LLC-B de peor pronóstico.

2.4.1.4. Crecimiento y evolución de las células de la LLC-B.

Todas estas consideraciones sugieren un modelo con el cual se pueden construir futuras hipótesis. Este modelo excluye un defecto intrínseco de la apoptosis en todos los miembros del clon leucémico. Si la división celular continúa, facilitada por señales externas o no, los niveles de recambio celular “in vivo” pueden bastar para promover el desarrollo y crecimiento de subclones con nuevas lesiones genéticas y con una ventaja proliferativa.

2.4.1.5. Desarrollo de LLC-B a partir de un linfocito B normal.

La mayoría de los linfocitos B normales sin la mutación de los genes de las cadenas pesadas producen anticuerpos capaces de unirse a múltiples antígenos dando lugar a la primera línea de defensa contra microorganismos.

Las formas no mutadas se originan fuera del centro marginal, en la zona marginal sin interacción de linfocitos T cooperadores ni células accesorias. La expansión ocurre cuando una célula B ha desarrollado una anomalía genética (lesión inductora) que le permite escapar del control de su prole. La conversión leucémica ocurrirá tras estimulaciones repetidas del RCB por auto o alo-antígenos y eventualmente tras la aparición de nuevas alteraciones genéticas.

Un mecanismo similar puede ocurrir en las formas mutadas, porque las mutaciones de las cadenas pesadas pueden ocurrir sin la ayuda de las células T, fuera del centro germinal, pudiendo ser sometidas a auto-reactividad. Tal expansión podría detenerse si las mutaciones de los genes de las cadenas pesadas alteraran la estructura de los RCB de manera que desapareciera la estimulación antigénica, lo que se ha denominado “ignorancia clonal”.

Es difícil deducir el origen de la célula de la LLC, sin embargo, ciertas características funcionales de la célula pueden ayudar a delinearla. La célula B normal que produce, como se ha indicado previamente, auto-anticuerpos y anticuerpos contra carbohidratos de bacterias y virus reside en la zona marginal. Es posible que las células B de la zona marginal sean los precursores tanto de las células mutadas como no mutadas porque los receptores de la célula de la LLC son estructuralmente similares a esos que reaccionan con auto-antígenos y microorganismos. Alternativamente, las células de la forma mutada podrían originarse en células B estimuladas, T dependientes que han pasado a través del centro germinal.

Otros potenciales precursores son las células B1 que comparten características con las células de la zona marginal, con células pre-B inmaduras y con células B transicionales que pueden también expresar receptores auto-reactivos. Las células transicionales B rutinariamente salen de la médula ósea y atraviesan la circulación hacia el tejido linfoide sólido. Una alteración genética podría permitir que alguna de esas células sobreviviera y fuera sensible a auto-antígenos produciéndose una transformación leucémica en las células no mutadas.

Como hemos comentado previamente ambos trabajos (Ferrarini M. y Chiorazzi N., 2.004; Chiorazzi N. y cols, 2.005) sugieren que las dos formas (mutadas y no mutadas) derivan de células con experiencia antigénica a diferencia de lo que se pensaba hasta ahora, que los linfocitos de la LLC-B procedían de células vírgenes en las formas no mutadas y de células memoria en las formas mutadas. La estimulación antigénica, además de ocurrir antes de la transformación, puede continuar ejerciendo su efecto en las células transformadas, promoviendo su supervivencia y expansión.

A continuación exponemos el papel de los factores promotores en la evolución del clon leucémico:

1. Expresión de los marcadores de activación de las células de la LLC-B.

El fenotipo de las células de la LLC-B es el de una célula B activada. Las células de la LLC-B expresan CD27, un marcador de activación y de célula memoria B. También hay variación en la expresión de CD69b que se muestra con más intensidad en las células de los casos no mutados, mientras que CD71 es más abundante en los casos mutados. CD38, marcador de activación de las células B, también es predominantemente expresado en la forma no mutada.

2. Longitud de los telómeros.

La longitud de los telómeros de las células de la LLC-B es más corta que en las células B CD5+, lo que indica una mayor replicación en las células leucémicas. Además los telómeros de las formas no mutadas son significativamente más cortos que los de las formas mutadas, lo que sugiere una mayor actividad proliferativa en este grupo. Finalmente, la actividad telomerasa de las células de las formas no mutadas es mayor.

3. Recambio celular leucémico in vivo.

El tiempo de doblaje linfocitario, una medida del porcentaje de replicación del clon maligno y que tiene un valor pronóstico, parece inadecuado para determinar el modelo de crecimiento del mismo, ya que la expansión y supervivencia del clon leucémico es un proceso dinámico que puede estar regulado por lesiones citogenéticas.

4. Aparición de nuevas lesiones genéticas.

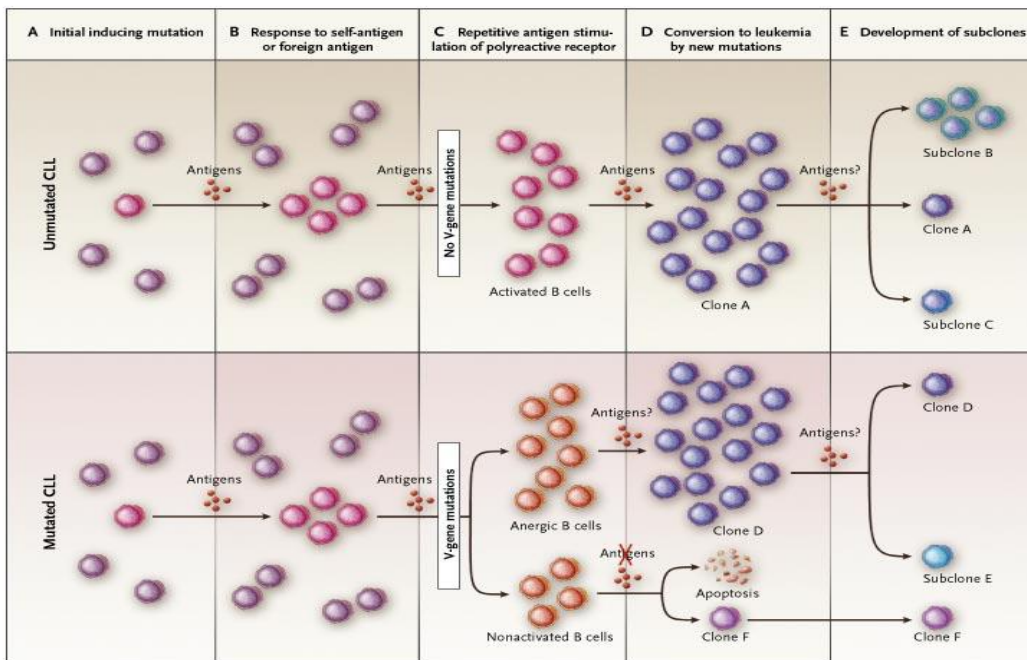
Por último, la aparición de nuevas lesiones genéticas también puede apoyar la teoría de la proliferación. La delección 13q14.3 representa un caso especial porque ocurre en más del 50% de los casos siendo en algunos de ellos en estadios tempranos de la enfermedad. Las delecciones 11q22-23, 17p13, 6q21 y la trisomía 12 son observadas en una proporción variable y usualmente se presentan en un pequeño subclon, particularmente en los estadios iniciales de la enfermedad. Sin embargo, estos subclones pueden expandirse y hacerse dominantes proporcionando un crecimiento aventajado de las células leucémicas. En ausencia de movimiento celular tal ventaja puede ser insignificante.

A continuación resumimos el modelo del desarrollo y evolución de las células de la LLC-B. (Chiorazzi N. y cols, 2.005) (Figura 5):

1. La interacción entre un antígeno y el RCB induce una amplificación clonal.
2. Si la interacción entre un antígeno y el RCB ocurre en un linfocito B con factor inductor, la lesión inicial provocada en esa célula proporciona una ventaja proliferativa de ésta sobre otros clones estimulados por el mismo u otro antígeno.
3. En la forma no mutada al no existir lesión en los genes de la cadena variable, continúa produciéndose la misma estimulación. Por el contrario, en la forma mutada, dicha mutación puede modificar la unión al antígeno o autoantígeno quedando la célula B inactivada o quedando anérgica por la estimulación excesiva.

4. Posteriormente lesiones adicionales a nivel de ADN causan que la célula cruce el límite de “normalidad” a “leucemia”.
5. Diferencias en la señal realizada a través del RCB y otros receptores determinan la extensión de la expansión clonal. La aparición de nuevos cambios genéticos (deleción en 13q, 11q y 17p o duplicación del cromosoma 12) puede originar la aparición de subclones que determinen el curso de la enfermedad.

Fig5. Modelo del desarrollo y evolución de las células de la LLC-B (Chiorazzi N. y cols, The New England Journal of Medicine, 2.005).



Este modelo dinámico propuesto por Ferrarini y Chiorazzi contrasta con la visión general mantenida hasta ahora de que la LLC-B era una enfermedad acumulativa caracterizada por un defecto en la apoptosis.

2.4.2. Resistencia a la apoptosis.

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso biológico imprescindible para el correcto desarrollo y funcionamiento del organismo. Este proceso está altamente controlado para mantener la homeostasis en el organismo, ya que los desajustes, tanto por exceso como por defecto, conllevan diferentes tipos de enfermedades. En los últimos años se ha avanzado mucho en su

conocimiento. Existen dos vías en la inducción de la apoptosis: la vía mitocondrial (intrínseca) y la vía inducida por receptores de muerte (vía extrínseca).

2.4.2.1. Vía intrínseca o mitocondrial.

La vía intrínseca está modulada por las proteínas de la superfamilia Bcl-2. Su activación produce una pérdida de potencial de membrana mitocondrial, la salida de varias proteínas, como el citocromo C, de la mitocondria y la activación citosólica de proteasas (caspasas) que inducen la apoptosis. Actualmente se conocen 20 proteínas de la superfamilia Bcl-2. Todas ellas contienen por lo menos uno de los dominios conservados conocidos como *Bcl-2 homology domains* (BH1 a BH4). Se dividen en tres grupos de acuerdo con su estructura y función: a) proteínas antiapoptóticas, que contienen por lo menos el dominio BH1 y BH2: Bcl-2, Bcl-x1 y Mcl-1; b) proapoptóticas multidominio, que contienen los dominios BH1, BH2 y BH3: Bax, Bak, Mtd y Bcl-xs); y c) proteínas “solo BH3”, de las cuales se han identificado 10 subtipos y no pueden ejercer su acción apoptótica en ausencia de Bax y Bak. El mecanismo de acción de Bcl-2 es desconocido, pero se han descrito diversos mecanismos. Se postula que pueden formar heterodímeros entre las formas antiapoptóticas y proapoptóticas y estas uniones anularían su funcionalidad. De esta manera, un cambio en los niveles de proteína que modifiquen la proporción relativa, como la descrita para el heterodímero Bcl-2/ Bax, pueden explicar el efecto regulador sobre la apoptosis. Igualmente se han descrito cambios en su localización subcelular. La mayoría de proteínas de la familia de Bcl-2 tienen un dominio de anclaje a membrana. Bcl-2 se localiza en la membrana mitocondrial externa, en la membrana nuclear y en el retículo endoplasmático. En cambio, Bid, Bad, Bax y Bim se localizan principalmente en el citosol, y en respuesta a estímulos apoptóticos, se translocan a la mitocondria. Los cambios de localización pueden ser debidos a cambios de conformación u oligomerización, como ocurre con la proteína Bax, a cambios en su estado de fosforilación descrito en la proteína Bad o por proteólisis como ocurre en la proteína Bid. Otra hipótesis es que algunas proteínas de la familia del Bcl-2, como, por ejemplo, Bcl-x1, Bcl-2 y Bax pueden formar canales iónicos. Todas estas propiedades que ejercen los miembros de la familia Bcl-2 son cruciales en el mantenimiento de la integridad mitocondrial y para la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis.

Diversos estudios en LLC-B han demostrado la implicación de proteínas de la familia Bcl-2 en el mecanismo de muerte celular programada, existiendo sobre-expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1, y una baja expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bcl-xs. También se ha demostrado que un cociente elevado Bcl-2/Bax está relacionado significativamente

con enfermedad refractaria al tratamiento, progresión de la enfermedad y corta supervivencia (Keating MJ., 1.999). De igual modo, otros trabajos han puesto de manifiesto que el tratamiento de la LLC-B con dexametasona, fludarabina o el esquema quimioterápico que asocia fludarabina, mitoxantrone y ciclofosfamida (FMC) induce cambios de conformación u oligomerización de Bax y Bak. Estos cambios suponen una translocación que expone el terminal NH₂ y el terminal hidrófobo COOH- a la mitocondria y preceden a la disfunción mitocondrial y a la activación de las caspasas; y son independientes de la activación de P53. Además, los análogos de las purinas inhiben la ADN polimerasa y la ribonucleótido reductasa, promoviendo la apoptosis (Molica M. y cols, 2.003).

Como consecuencia de las proteínas proapoptóticas, “sólo”-BH3 y de Bax/ Bak se produce la liberación al citosol del citocromo c. Este se une a la proteína adaptadora Apaf-1 formando un complejo llamado apoptosoma que recluta a una cisteín-proteasa denominada caspasa 9 en la cual se produce un cambio conformacional que provoca su activación y el inicio de una serie de reacciones proteolíticas conocidas como la “cascada de las caspasas”. Las caspasas activadas ocasionan la rotura controlada de las proteínas y estructuras celulares, desmontando ordenadamente la célula y dando lugar al fenotipo apoptótico. Las caspasas son, por lo tanto, las principales ejecutoras de la apoptosis. Las alteraciones en la familia de las caspasas, a su vez moduladas por la familia Bcl-2 (Voutsadaki IA. y cols, 2.000; Shimmer AD. y cols, 2.003), se han implicado en la inhibición de la apoptosis. En este sentido, existen estudios con inmunotoxinas (BL22 o HA22) que han demostrado que éstas inducen la apoptosis a través de las caspasas produciendo un daño en la mitocondria (Decker T. y cols, 2.004)

En el proceso de la apoptosis, además de citocromo c, las mitocondrias liberan la proteína Smac/Diablo. Smac/Diablo se une a unas proteínas que son inhibidores endógenos de las caspasas (IAP) y asegura que dichas proteínas no intenten parar el proceso apoptótico en curso. Otros factores como la despolarización de la mitocondria produce también la liberación del Factor Inductor de Apoptosis (AIF) y de la endonucleasa Endo G. Igualmente están siendo investigados inhibidores de la proteína cinasa C por su potente inducción a la apoptosis, mediada por su acción sobre las caspasas (Snowden RT. y cols, 2.003).

2.4.2.2. Apoptosis mediada por receptores (vía extrínseca).

En esta vía la apoptosis se induce tras la unión de una proteína extracelular (mensajero mortal) a su receptor. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor del TNF. La ruta mejor conocida es la iniciada por el ligando de Fas (FasL), una proteína de membrana que induce apoptosis tras su unión a su receptor, Fas. Tras su ligación y oligomerización, Fas se une a la

proteína adaptadora FADD, que a su vez se une a la caspasa 8. Esto produce una autoactivación proteolítica (Naval J. y cols, 2.004).

Otros estudios recientes sobre el receptor P2X7, un canal iónico de membrana relacionado fundamentalmente con el tráfico de ATP e implicado en la apoptosis, han sugerido su contribución en la patogenia de la enfermedad. El gen de este receptor se localiza en el cromosoma 12, sin embargo no se ha encontrado asociación entre la trisomía 12 y el genotipo P2X7, ni influencia de este receptor en el curso clínico de la enfermedad (Zhang LY. y cols, 2.003).

Finalmente, mutaciones en el gen P53 y en el gen ATM también se han relacionado con la resistencia a la apoptosis (Wattel E. y cols, 1.994; Dohner H. y cols, 1.995) y con resistencia celular a la apoptosis inducida por ciertos tratamientos quimioterápicos. Como hemos comentado en el apartado anterior, existe un gen localizado en 14q32.1, el gen Tc1-1 que aunque está implicado en la patogenia de la leucemia prolinfocítica T y es expresado por las células de la LLC, no ha sido todavía incluido como factor inductor de esta enfermedad (Herling M. y cols, 2.006).

En resumen, el conocimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en el control de la apoptosis puede ser básico para el desarrollo de nuevas terapias más específicas y selectivas.

2.4.3. Inmunodeficiencia. Anomalías en la interacción de las células T y los linfocitos B neoplásicos.

En la LLC-B existe un estado de inmunodeficiencia con múltiples manifestaciones; en este sentido, la hipogammaglobulinemia, es un hallazgo clásico y la expresión más evidente de este trastorno, apareciendo entre un 20 y un 60% de los pacientes. El estado inmunodeficiente de la LLC-B tiene un origen multifactorial en el que están implicados:

- Anomalías funcionales de las células B implicadas en su interacción con las células T. A este respecto, se ha demostrado que existen alteraciones tanto en el receptor de las células B (SIg), como en CD40 y CD95, de manera que la célula leucémica no responde adecuadamente a estímulos externos ni al control por parte de los linfocitos T. Además la interacción entre el antígeno CD40 y su ligando CD154 es anómala.
- Infiltración masiva de la médula ósea.
- Alteración de las subpoblaciones linfocitarias T. En este sentido, cabe recordar que se ha observado que el cociente CD4/ CD8 normal está relacionado con un curso indolente de la enfermedad (Guarini A. y cols, 2.003).
- La actividad supresora de las células NK (Villamor N. y cols, 1.989; Ziegler HW. y cols, 1.981).

- Intervención de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF). Niveles elevados de IL-8 se han correlacionado con otros factores pronóstico tales como el estadio clínico según RAI y los niveles de Beta-2-microglobulina, y está asociado con un incremento en el riesgo de mortalidad; en relación a ello, se ha postulado el papel terapéutico de los inhibidores de IL-8 (Wierda WG. y cols, 2.003).
- Anomalías en el complemento y la función granulo-monocitaria.

2.4.4. Angiogénesis.

En cuarto lugar han sido involucrados trastornos de la angiogénesis, existiendo un desequilibrio en la producción de factores angiogénicos por parte de las células leucémicas. La angiogenesis está influenciada por una serie de factores donde están incluidos las citoquinas, la matriz extracelular y otros componentes celulares, incluidos los pericitos. Ha sido demostrada la correlación entre la densidad de vasos sanguíneos en médula ósea y el estadio clínico (Kini AR. y cols, 2.000). Otros estudios han observado un aumento de factores pro-angiogénicos y una correlación entre factores vasculares y la supervivencia (Molica S. y cols, 2.002).

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es un estimulador de la angiogénesis y se cree que es un mediador importante en la angiogénesis tumoral. Se han realizado trabajos donde pacientes, con estadio A de Binet o I-II de Rai, con niveles más elevados de este factor que la media, tienen una supervivencia libre de progresión significativamente más corta; en este sentido se ha postulado que su evaluación podría contribuir a discriminar pacientes de alto riesgo en estadios precoces de la enfermedad (Molica S. y cols, 1.999). Además se ha mostrado que las células de la LLC-B secretan espontáneamente este factor (Kay NE. y cols, 2.002; Chen H. y cols, 2.000) y expresan receptores de membrana para el mismo, lo que ha permitido observar que al bloquear la fosforilación de este receptor se suprime la producción de VEGF y con ello se induce a la apoptosis (Lee YK. y cols, 2.004).

Por otro lado ocurre una liberación de factores del estroma (Factor de crecimiento básico fibroblástico y Factor derivado del estroma) que interactúan con quimiocinas del grupo CXCR3 inhibiendo la apoptosis y promoviendo la acumulación de células en la médula ósea, lo que revela la importancia del microambiente donde se desarrolla la célula de la LLC en la patogenia de la enfermedad.

Un reciente estudio sugiere que los niveles de angiogenina en suero de pacientes con LLC-B pueden predecir el curso clínico en estadios precoces de la enfermedad ayudando por tanto a la estratificación de estos pacientes (Molica S. y cols, 2.004).

En el momento actual, se desconoce hasta que punto los factores enunciados anteriormente son un mecanismo activo en el desarrollo de la enfermedad o son un epifenómeno de las alteraciones causantes de las misma.

2.5. HALLAZGOS BIOLÓGICOS CON VALOR PRONOSTICO EN LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B.

Como hemos comentado previamente, existe una gran heterogeneidad en el curso clínico de la enfermedad. Algunos pacientes con LLC-B sobreviven durante décadas después del diagnóstico inicial y nunca requieren tratamiento, mientras que otros evolucionan desfavorablemente, con supervivencias inferiores a los ocho años. A consecuencia de ello, la búsqueda de indicadores pronósticos de la enfermedad ha sido una constante desde mediados del siglo pasado. En este sentido, Rai y cols en 1.975, y posteriormente Binet y cols en 1.981, crearon sistemas pioneros de estadiaje basados en síntomas, signos y datos elementales de laboratorio, permitiendo así clasificar por primera vez a los pacientes en categorías distintas de una manera efectiva.

El hallazgo de factores pronóstico ha permitido la discriminación de pacientes en categorías de riesgo. Además de los estadios de Rai y Binet, otros factores pronóstico tradicionales como el sexo, la edad y la cinética tumoral (tiempo de doblaje linfocitario) y otros parámetros serológicos como β 2-microglobulina, LDH, timidin-kinasa y CD23 han sido considerados. Más recientemente, factores inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares han permitido precisar estos grupos pronóstico. Revisaremos a continuación con más detalle estos aspectos.

2.5.1. Factores clásicos: Estadiaje clínico, tiempo de doblaje linfocitario, patrón de infiltración en la biopsia ósea, β 2 microglobulina.

El estadiaje clínico propuesto por Rai y cols, en 1.975 y, posteriormente por Binet y cols, en 1.981, basado en la carga tumoral fue el primer sistema de estratificación con valor pronóstico en LLC. Este sistema estaba basado en la presencia de adenopatías, organomegalias y citopenias. Rai y cols demostraron la correlación entre el estadio clínico y la supervivencia. A pesar de ello se ha encontrado una significativa heterogenicidad en la conducta clínica de los pacientes dentro de un mismo estadio. Otros factores demográficos y clínicos, como la edad, el sexo o el estado general del paciente, también han sido estudiados sin encontrar una relación significativa con el pronóstico.

El tiempo de doblaje linfocitario (TDL) se calcula determinando el número de meses en el que se duplica el recuento de linfocitos. Los pacientes con un TDL menor o igual a 12 meses tenían una mediana de supervivencia de 61 meses, mientras que ésta no era alcanzada por los pacientes con un TDL mayor de 12 meses (Montserrat E. y cols, 1.986). Aunque otros trabajos han confirmado la utilidad de este parámetro para pacientes en estadios precoces, se ha debatido por una parte, que su evaluación se hace de manera retrospectiva y, en segundo lugar que puede estar influenciada por otros factores del huésped (tratamiento, procesos infecciosos, ...). Además, el TDL puede variar bastante en el tiempo.

El aspirado de médula ósea de los pacientes con LLC-B revela en la gran mayoría de los casos infiltración por elementos linfoides. En este sentido, en la biopsia ósea se han definido 4 patrones de infiltración ósea: nodular, intersticial, mixto y difuso. Los tres primeros se observan en las fases iniciales de la enfermedad y el difuso en las más avanzadas. El estudio clásico de Rozman y Montserrat demostró que el patrón de infiltración ósea tiene valor predictivo, de manera que un patrón difuso se asocia a peor pronóstico con mayor probabilidad de progresión y supervivencia más corta independientemente del estadio clínico (Rozman C. y cols, 1.981 y 1.984).

La β 2-microglobulina es un marcador que se correlaciona con la masa tumoral y el estadio clínico en pacientes diagnosticados de LLC-B. Existen estudios donde se ha demostrado que la β 2-microglobulina es un fuerte predictor de supervivencia. Sin embargo, su papel en el manejo de pacientes en estadios precoces no está bien definido (Keating M. y cols, 1.995).

2.5.2. Enzima timidin-kinasa.

Esta enzima está implicada en la síntesis de DNA, siendo un marcador de proliferación celular. Estudios iniciales observaron que niveles elevados de timidin-kinasa estaban relacionados con un estadio avanzado y progresión de la enfermedad (Kallander CF. y cols, 1.984), de manera que los pacientes podrían dividirse en dos grupos pronósticos en función de los niveles iniciales de esta enzima. Posteriormente otros trabajos han demostrado que existe correlación de esta enzima con otros factores como el estado mutacional de las cadenas pesadas de los genes de las inmunoglobulinas (Magnac C. y cols, 2.003), así como con los niveles séricos de LDH y de β 2-microglobulina, siendo los niveles de esta enzima predictivos de supervivencia y respuesta al tratamiento (Levy V. y cols, 1.999; Di Raimondo F. y cols, 2.001). Por lo tanto sería un potencial marcador pronóstico.

2.5.3. Estudios inmunofenotípicos.

2.5.3.1. Score inmunofenotípico.

El elemento clave para el diagnóstico de la LLC-B es la existencia de una linfocitosis absoluta (> 5.000 linfocitos/ μL), monoclonal y con un inmunofenotipo (IF) característico que además de la expresión de CD19, CD5 y CD23, conlleva la expresión de otros antígenos con un perfil característico; así en los casos típicos CD20, CD22, CD79b y las inmunoglobulinas de superficie se expresan con menor densidad que en cualquier otro linfocito B maduro, mientras que el antígeno definido por FMC7 no se expresaría. Este patrón típico con un score máximo de 6 llevó al grupo de Matutes a considerar que el alejamiento de la normalidad (*score* bajos) podrían reflejar casos con peor pronóstico, lo que posteriormente se confirmó ampliamente (Matutes E. y cols, 1.994; Moreau EJ. y cols, 1.997).

2.5.3.2. Antígeno de superficie CD38.

El antígeno de superficie CD38 es una glicoproteína de membrana tipo II. Es un marcador panleucocitario con expresión variable. Se expresa en células CD34+, células del centro germinal, linfocitos maduros activados, células plasmáticas y precursores mieloides. Entre sus múltiples funciones destaca su actividad enzimática implicada en la liberación de calcio intracelular y su actividad como molécula de adhesión a CD31 (células T) en el endotelio vascular. Como se ha mencionado previamente, en un trabajo publicado en 2.005 por Deaglio S. y cols, la interacción con CD31 origina una señal que induce sobreexpresión de CD100 que a su vez interactúa con plexina-B1 proporcionando mayor supervivencia a la célula, incluso a la célula B normal. Por último el antígeno CD38 también está involucrado en la proliferación linfoide por regular la expresión de bcl-2.

Existen tres patrones de expresión: CD38+, CD38- y bimodal (Ghia P. y cols, 2.003). Diversos estudios han demostrado que el antígeno de superficie CD38 es un marcador pronóstico independiente, cuya expresión se relaciona con supervivencias más cortas (Ibrahim S. y cols, 2.001). También se ha objetivado una diferencia estadísticamente significativa, de manera que los pacientes que expresaban el Ag de superficie CD38 tenían con mayor frecuencia hepatoesplenomegalia, afectación de más áreas ganglionares, cifras más bajas de hemoglobina y elevación de β 2-microglobulina, y más recientemente que estos pacientes presentan más alteraciones cromosómicas o del gen P53 (Ottaggio L. y cols, 2.003).

Por otra parte, el significado pronóstico último de la expresión de este antígeno es controvertido ya que algunos autores han descrito variaciones en su expresión durante el curso de la enfermedad y también en relación a tratamientos u otros procesos intercurrentes (Ibrahim S. y cols, 2.001; Hamblin TJ. y cols, 2.002; Krober A. y cols, 2.002; Chan C. y cols, 2.002) mientras que en otros estudios no se ha observado tal variación (Damle RN. y cols, 2.002; Durig J. y cols, 2.002; D´Arena y cols, 2.002).

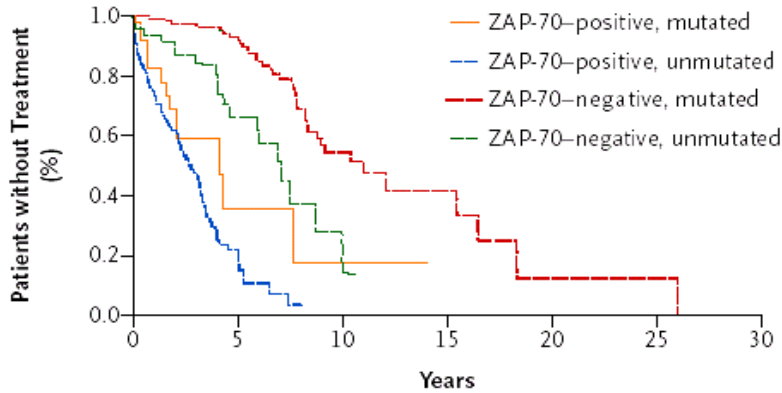
2.5.3.3. Proteína ZAP70.

La proteína ZAP-70 es un miembro de la familia tirosin-kinasa que normalmente se expresa en células T y NK. Tiene un papel crítico en el inicio de la señalización T. Se ha demostrado que es un marcador pronóstico independiente pero que, a diferencia del antígeno de superficie CD38, no parece variar durante el curso de la enfermedad (Crespo M. y cols, 2.003; Durig J. y cols, 2.003). Diversos estudios han demostrado su correlación con el estado mutacional de IgVH, progresión de la enfermedad, supervivencia y expresión del antígeno de superficie CD38 (Crespo M. y cols, 2.003).

Utilizando microarrays (Klein U. y cols, 2.001; Rosenwald A. y cols, 2.001) se ha demostrado que las células de la LLC-B tienen un perfil genético característico, en el cual la expresión de un subgrupo de genes, en el que se incluyen ZAP70, IM1286077 y lectina tipo C, se correlaciona con el estado mutacional (Rosenwald A. y cols, 2.001, Chen L. y cols, 2.002). La expresión del gen que codifica la proteína ZAP-70 fue cinco veces más alta en pacientes que no presentaban la mutación de los genes de las cadenas pesadas de las Ig que en aquellos que la presentaban y fue el mejor discriminador entre ambos grupos.

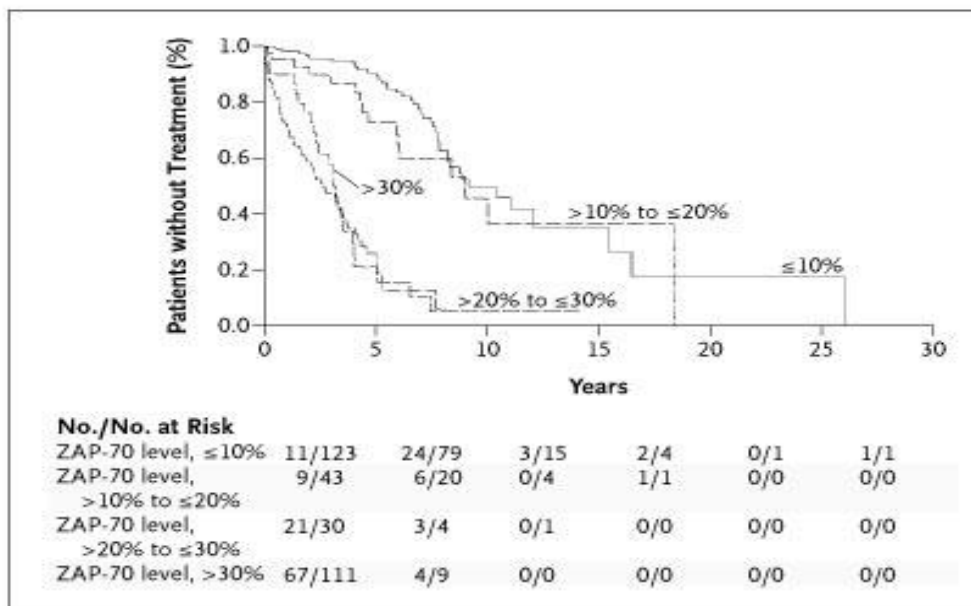
Posteriormente, se ha propuesto la determinación de esta proteína mediante citometría de flujo dado que se observó que existía una concordancia con la expresión genética. Además se confirmó que es un marcador pronóstico fidedigno equivalente a la determinación del estado mutacional. Aunque la ausencia de mutación de los genes de las cadenas pesadas de las Ig está fuertemente asociada con la expresión de ZAP-70, esta última es un potente predictor de la necesidad de tratamiento en LLC-B (Crespo M. y cols, 2.003; Rassenti LZ. y cols, 2.004). Estudios más recientes (Orchard JA. y cols, 2.004; Rassenti L. y cols, 2.004) han demostrado que no hay una relación absoluta entre la expresión de ZAP-70 y el estado mutacional de las cadenas pesadas de las Igs, con discrepancias hasta en un 25% de los casos. Esto puede deberse a la implicación de otros factores de mal pronóstico como la del17p, del11q o a mutaciones en Vh3-21 (Krober A. y cols, 2.006).

Fig6. Relación entre la expresión de ZAP70, estado mutacional de IgVH y tiempo entre diagnóstico y el primer tratamiento (Crespo M. y cols, The New England Journal of Medicine 2.003).



El significado pronóstico de la expresión de esta proteína también es controvertido dado que no está establecido el punto de corte para designar su expresión como positiva o negativa (Letestu R. y cols, 2.006; Gachard N. y cols, 2.007; Oliveira A. y cols, 2.011) y su determinación muestra notables diferencias inter-laboratorios.

Fig7. Correlación entre la expresión de ZAP70 y supervivencia en LLC-B (Crespo M. y cols, The New England Journal of Medicine 2.003).



2.5.4. Alteraciones citogenéticas.

El mecanismo que lleva a las alteraciones cromosómicas clásicas de la LLC-B es desconocido, sin embargo habría que recordar dos características de la LLC-B: el acortamiento de la longitud de los telómeros y la expresión de AID (activación inducida por citidina-deaminasa); ambos factores implicados en los procesos de mutación somática.

La aplicación de técnicas de hibridación in situ con fluorescencia ha mejorado el bajo rendimiento de la citogenética convencional, pasando a detectarse alteraciones cromosómicas hasta en un 80% de los pacientes en el momento del diagnóstico. Las anomalías más comunes por orden de aparición son: la deleción del brazo largo del cromosoma 13 (del 13q), deleción del brazo largo del cromosoma 11 (del 11q), trisomía 12 (+12), deleción del brazo corto del cromosoma 17 (del 17p) y deleción del brazo largo del cromosoma 6 (del 6q). Diversos estudios han demostrado la correlación de estas anomalías con aspectos clínicos y evolutivos de la enfermedad (Döhner H. y cols, 2.000) (Figura 8), con la expresión del antígeno de superficie CD38 (Dewald GW. y cols, 2.003; Ottaggio L. y cols, 2.003) y el estado mutacional de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (Krober A. y cols, 2.002; Ottaggio L. y cols, 2.003) (Figura 9).

Fig 8. Alteraciones cromosómicas y supervivencia (Döhner H. y cols, The New England Journal of Medicine 2.000).

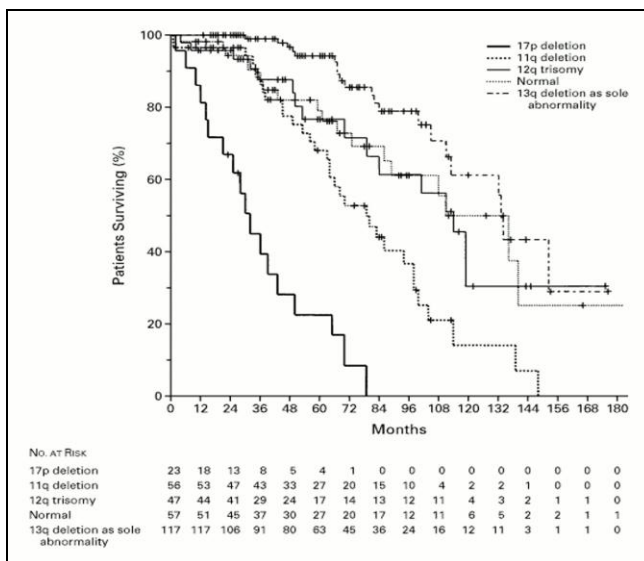
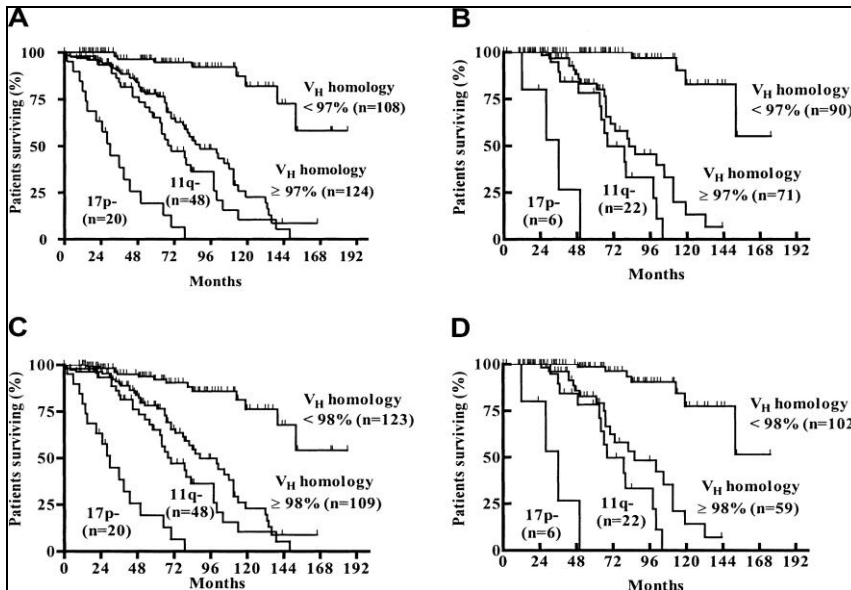


Fig9. Relación entre citogenética, estado mutacional de IgVH y supervivencia (Krober A. y cols, Blood 2.002).



La delección del brazo largo del cromosoma 13 (del 13q14) puede ser detectada en aproximadamente la mitad de los casos. En esta región se localizan los genes RB-1 y C13S25. Se asocia a linfocitosis moderada, morfología típica de los linfocitos y presencia de la mutación somática de las cadenas pesadas de los genes de las inmunoglobulinas. Cuando se detecta como alteración aislada se ha relacionado con buen pronóstico (supervivencia 133 meses), aunque Hernández y cols en 2.010 han demostrado que, un mayor número de pérdidas en 13q14 (>80%) se asocia a mayor proliferación y menor apoptosis de las células leucémicas; y lo que es más relevante, a una menor supervivencia de los pacientes al compararlos con los que presentan +12, citogenética normal y/o un porcentaje bajo de células con del13q.

La trisomía 12 se detecta en un 15-25% de los casos. Cursa con la presencia en sangre periférica de linfocitos de morfología atípica, sobre todo prolinfocitos, con un inmunofenotipo atípico, expresión de CD38 y ausencia de la mutación somática de las cadenas pesadas de los genes de las inmunoglobulinas (Matutes E. y Polliack A; 2.000). Su pronóstico es intermedio (supervivencia media de 114 meses).

La delección del brazo largo del cromosoma 11 (del 11q22.3-q23.1) se detecta en una quinta parte de los casos, afectando más frecuentemente a varones jóvenes con grandes adenopatías, estadios clínicos avanzados y una mayor resistencia al tratamiento (Döhner H y cols, 1.997). En alrededor del 20% de los pacientes están implicados los genes ATM (*ataxia-telangiectasia*) y RDX.

La delección del brazo corto del cromosoma 17 (del 17p) aparece en 4-17% de los casos. Clásicamente se asocia a LLC atípica, se relaciona con mutaciones del gen P53, y tiene muy mal pronóstico. Esta alteración se caracteriza por tener una mala respuesta al tratamiento, refractariedad a la fludarabina y una supervivencia global y libre de tratamiento más corta (Döhner H y cols, 1.997; Oscier DG y cols, 2.002; Zenz T y cols, 2.008; Zenz T y cols, 2.010; González D y cols, 2.011).

La delección del brazo largo del cromosoma 6 (del 6q), la menos frecuente aparece en un 2-5%, se relaciona con mayor porcentaje de prolinfocitos, positividad de CD38 y con enfermedad agresiva. Sin embargo, un estudio reciente la coloca en un grupo de riesgo intermedio (Cuneo A. y cols, 2.004).

Por último, varios autores han demostrado que en más de un 25% de los pacientes aparecen alteraciones citogenéticas adicionales durante el curso de la enfermedad, fenómeno denominado evolución clonal (Fegan C. y cols, 1.995; Finn WG. y cols, 1.998; Chevalier P. y cols, 2.002; Shanafelt T. y cols, 2.006; Stilgenbauer S. y cols, 2.007), y que se asocia a una supervivencia más corta, sobre todo en aquellos pacientes que adquieren la delección 17p o delección 11q, siendo la mediana de supervivencia tras la evolución clonal de solo 1.3 años. En el año 2.006, Shanafelt T. y cols encontraron una asociación entre la evolución clonal y la expresión de la proteína ZAP70, de manera que en los pacientes ZAP-70 positivos era más probable que se produjera la adquisición de nuevas alteraciones citogenéticas de mal pronóstico. Posteriormente, Stilgenbauer S. y cols, en 2.007, observaron que la evolución clonal ocurría en casos que no presentaban la mutación de los genes de las cadenas pesadas de las Igs. El escaso número de pacientes incluidos en estos estudios hacen que estos datos deban ser interpretados con precaución por lo que son necesarias nuevas investigaciones que exploren la relación entre la evolución clonal y otros factores pronóstico de la LLC-B.

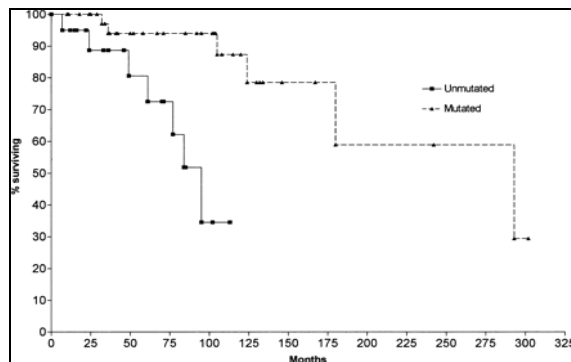
2.5.5. Estado mutacional de las cadenas pesadas de los genes de las inmunoglobulinas.

Tradicionalmente, se creía que las células de la LLC-B eran linfocitos B vírgenes que no estaban expuestos a antígenos en el centro germinal y por lo tanto no sufrían la mutación de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. En un estudio realizado en 1.998 (Fais F. y cols) y posteriormente, 2 publicaciones simultaneas en 1.999 (Damle RN. y cols, 1.999 y Hamblin TJ. y cols, 1.999) demostraron que, en aproximadamente el 50% de los casos, los linfocitos de la LLC-B presentaban mutaciones de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgVH) mientras que en el resto los genes no lo estaban. Esto indica la existencia de 2 formas

distintas de LLC-B con respecto a la célula de origen: una forma pre-germinal, en la que los genes no están mutados y otra post-germinal, en la que las células han entrado en contacto con antígenos experimentando mutaciones en las IgVH y adquiriendo memoria inmunológica. (Krober A. y cols, 2.002; Jelinek DF. y cols, 2.001; Tobin G. y cols, 2.002; Hamblin TJ. y cols, 2.002; Oscier DG. y cols, 2.002; Lin K. y cols, 2.002; Matrai Z. y cols, 2.001). Mas recientemente, otros grupos (Ferrarini M. y Chiorazzi N., 2.004; Chiorazzi N. y cols, 2.005) refieren que tanto en una forma como en otra, los linfocitos han tenido contacto previamente con antígenos.

Se ha demostrado que ambas formas tienen un pronóstico diferente, siendo peor en las formas no mutadas, diferencia que resultó estadísticamente significativa en pacientes con el mismo estadio (Figura 10) (Hamblin TJ. y cols, 2.002). Las formas no mutadas se han asociado con morfología atípica, estadio avanzado y enfermedad progresiva. Aunque el significado biológico del estado mutacional de IgVH no está claro, su significado pronóstico ha sido confirmado (Krober A. y cols, 2.002; Jelinek DF. y cols, 2.001; Tobin G. y cols, 2.002; Hamblin TJ. y cols, 2.002; Oscier DG. y cols, 2.002; Lin K. y cols, 2.002; Matrai Z. y cols, 2.001).

Fig10. Estado mutacional de los genes de las cadenas pesadas de las IgVH y supervivencia en pacientes con el mismo estadio clínico (Hamblin TJ. y cols, Blood 2.002).

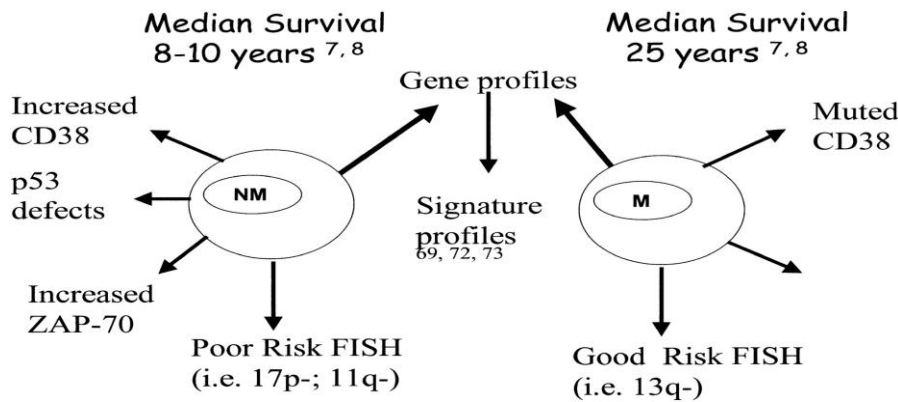


Para que se produzca la hipermutación somática se requiere de la unión del RCB al antígeno, la activación celular y la cooperación de los linfocitos T y otras células (Chiorazzi N. y cols, 2.003). También es esencial la presencia de un miembro de la familia citidina deaminasa. Una alta expresión de ésta, está asociada con formas no mutadas y alteraciones cromosómicas desfavorables (Heintel D. y cols, 2.004).

Se ha descrito un subgrupo de pacientes con LLC-B que presentan mutaciones en Vh3-21 cuyo pronóstico es similar al grupo de pacientes que no presenta la mutación de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgVH) (Tobin G. y cols, 2.002; Nolle F. y cols, 2.002).

Actualmente están siendo identificados múltiples factores pronóstico (la sobreexpresión del gen CLLU1, la expresión de CD49d, la expresión de las proteínas de la familia bcl2, la actividad de la telomerasa, marcadores de angiogénesis, CD23 y la expresión del gen de la lipoproteína lipasa) pero no están siendo utilizados para predecir el pronóstico.

Fig11. Diferencias fundamentales en la LLC según las mutaciones de los genes IgVH (Shanafelt Tait D. et al, Blood, 2.004).



2.6. LINFOCITOSIS B MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO.

Los progresos en la citometría de flujo han facilitado la discriminación entre linfocitosis clonal y reactiva y la diferenciación de la LLC-B de otros procesos linfoproliferativos. Además ha permitido medir el porcentaje de población linfoide clonal dentro de la población linfoide total, al igual que detectar una pequeña población linfoide clonal en personas asintomáticas con una cifra de linfocitos normal. Esto tiene 2 consecuencias, la primera la mayor capacidad para distinguir entre proceso clonal o reactivo u otros procesos linfoproliferativos. La segunda, la sensibilidad de esta técnica para descubrir que el 3% de los adultos mayores de 40 años tienen una población linfoide clonal circulante con fenotipo de LLC-B. Esto ha permitido desde el año 2.005 definir una nueva entidad diagnóstica llamada linfocitosis B monoclonal (LBM) (Marti GE. y cols, 2.005).

Muchos estudios han sido realizados en los últimos años para la detección de células con fenotipo LLC-B en la población general, con similar distribución en edad y sexo pero diferente prevalencia debido a las diferentes técnicas de citometría de flujo aplicadas (Rawstron AC. y cols, 2.008; Shim YK. y cols, 2.007; Ghia P. y cols, 2.004; Dagklis A. y cols, 2.009; Nieto WG. y cols, 2.009; Rachel JM. y cols, 2.007).

La linfocitosis B monoclonal (LBM)) se define como la presencia de una población linfoide clonal menor de 5×10^9 linfocitos /L (5000/ μ L) en sangre periférica en ausencia de adenopatías, organomegalias, citopenias o síntomas relacionados con la LLC-B (Marti GE. y cols, 2.005).

La LBM ha modificado el criterio diagnóstico de LLC-B, de tal manera que desde 2.008 los nuevos criterios del NCI-WG/IWCLL (Hallek M. y cols, 2.008) establecen la diferencia entre ambas entidades en base a un umbral de linfocitos B de 5×10^9 /L en sangre periférica y reclasifican a un gran número de pacientes diagnosticados previamente de LLC-B. La elección de este valor no está basada en datos objetivos de resultados clínicos por lo que algunos grupos (Shanafelt TD. y cols, 2.009b; Shanafelt TD. y cols, 2.009c; Molica S. y cols, 2.011) se han preguntado si este umbral es realmente predictivo de la evolución clínica (supervivencia libre de tratamiento y supervivencia global) en estadios iniciales de LBM/LLC-B. Esto supone la necesidad de nuevos estudios para definir un umbral óptimo y su validación posterior.

Una vez fueron establecidos los criterios diagnósticos de la LBM no estaba claro si el riesgo de desarrollar LLC era mayor con respecto a la población general y si existía o no relación biológica entre LBM y LLC. Con respecto al riesgo de desarrollar LLC, la alta prevalencia de LBM en la población general, al menos cien veces mayor que la de la LLC, indica que si la enfermedad progresa, lo hace en un porcentaje muy pequeño. Muchos estudios se han centrado en la biología de la LBM para determinar la relación de ésta con la progresión a LLC. Estudios recientes (Marti GE. y cols, 2.003; Rawstron A. y cols, 2.002) han demostrado una alta prevalencia de LBM en individuos de familias con LLC.

Tambien han sido estudiadas las anomalías cromosómicas en la LBM (Rawstron AC., 2.009). La mayor parte de ellas corresponden a la delección 13q14 en una significativa proporción de casos, aunque en la mayoría no en todas las células anómalas. Las alteraciones cromosómicas de mal pronóstico (del11q22.3-q23.1 y del17p) raramente se detectan y solo lo hacen en los casos en los que ya se presentan con linfocitosis.

Aproximadamente el 20-25% de los casos de LBM expresan CD38 y ZAP70 y presentan la mutación de los genes de las cadenas pesadas de las IgVH, todos ellos factores de mal pronóstico, sin existir por ello indicación de inicio de tratamiento.

Como hemos comentado previamente, la LBM puede progresar a LLC-B, en un porcentaje del 1 al 2% al año, por lo que el seguimiento de estos pacientes está justificado. Es importante que los pacientes que presentan una LBM sean conscientes de que el riesgo de precisar tratamiento es bajo pero mayor que para el resto de la población.

2.7. INDICE PRONOSTICO EN LEUCEMIA LINFATICA CRONICA B.

Actualmente los pacientes con LLC están siendo diagnosticados en estadios más precoces de la enfermedad. De éstos un 50% presentan marcadores de mal pronóstico en el momento del debut y en ellos podría estar justificado el inicio del tratamiento de manera precoz sobre todo si se trata de pacientes jóvenes. En el lado opuesto, nos encontramos pacientes añosos con marcadores de buen pronóstico y comorbilidades asociadas que presentan estadios B (o mas raramente C) indolentes, donde también es difícil decidir si se inicia o no tratamiento y cual es el esquema más adecuado.

El sistema de estadiaje de Rai y Binet ha identificado grupos de riesgo basados en características clínicas y biológicas, sin embargo dentro de cada subgrupo existe heterogenicidad por lo que ha sido necesario identificar otros factores pronóstico (edad, sexo, patrón de infiltración en médula ósea, tiempo de duplicación linfocitaria o presencia de prolinfocitos en sangre o en médula ósea). En los últimos años otros factores que se han correlacionado con un mal pronóstico han sido los niveles elevados de β 2-microglobulina, timidín-kinasa y CD23, la presencia de alteraciones cromosómicas como la deleción 17p o la deleción 11q, la no mutación de las cadenas pesadas de las Igs y la expresión del antígeno de superficie CD38 y la proteína ZAP-70. No cabe duda, que en la actualidad, el estudio de un paciente de nuevo diagnóstico debería incluir estadiaje, TDL, determinación de la expresión de CD38 y ZAP70, alteraciones genéticas determinadas por FISH y, si fuera posible el estado mutacional de los genes de las cadenas pesadas de las Ig. Así mismo, los pacientes con buen estado general y factores pronóstico desfavorables deberían ser incluidos en ensayos clínicos.

Existen varios grupos que han intentado desarrollar una estratificación del riesgo según factores pronóstico. Así, Montserrat en el año 2.001 propuso una estratificación basada en parámetros clásicos y nuevos que se muestran en la Tabla 2. En 2.003, el Grupo Alemán de Leucemia Linfática Crónica (GCLLSG/FCLLSG) desarrolló el concepto de comorbilidad y tratamiento adaptado al riesgo de progresión. En este protocolo (CLL7), en pacientes con estadio A de Binet, lo primero que se determinaba era el riesgo de progresión (Tabla 3). Este se establecía en función de cuatro variables: niveles de timidín-kinasa, tiempo de doblaje linfocitario, presencia o no de la deleción 11q o 17p y, por último, el estado mutacional de los genes de las cadenas pesadas de las IgS. Si el riesgo era alto (presencia de 2 o más factores) los pacientes eran seleccionados de forma randomizada para recibir el mismo tratamiento bien en el momento del diagnóstico o bien de forma diferida. En el año 2.007, Kay y Shanafelt también desarrollaron un sistema de estratificación basado en otros 4 factores pronóstico: FISH, CD38, IgVH y ZAP-70 (Tabla 4).

Aunque múltiples factores pronóstico clínico-biológicos han mostrado ser potentes predictores de supervivencia en LLC-B, obtener esta información de todos los pacientes no siempre es posible porque son técnicas costosas, difíciles de estandarizar y/o no están disponibles en la mayoría de los centros. Por este motivo, recientemente se ha desarrollado un método sencillo para poder estratificar a todos los pacientes con LLC-B. El grupo de Wierda W. y cols (Blood 2.007) ha propuesto un nomograma (Fig12) y un índice pronóstico (Tabla 5) en pacientes diagnosticados de LLC-B no tratados. Con el nomograma se obtiene una puntuación con la cual se identifica la probabilidad de supervivencia a los 5 y a los 10 años y se estima la supervivencia media. El índice pronóstico está basado en 6 factores pronóstico independientes (edad, sexo, estadiaje de Rai, número de regiones ganglionares afectadas, número de linfocitos y niveles de β 2-microglobulina) y estratifica a los pacientes en 3 grupos de riesgo: bajo (1-3), intermedio (4-7) y alto (\geq 8). El tiempo de supervivencia para los 3 grupos fue: no alcanzado para el bajo riesgo, 10.3 años para el riesgo intermedio y 5.4 años para el riesgo alto.

A raíz de este estudio se han realizado múltiples trabajos con el objetivo de confirmar la validez y reproductibilidad de este nuevo índice pronóstico (Shanafelt TD. y cols, 2.009a; González-Rodríguez AP. y cols, 2.009, Molica S. y cols, 2.010). Igualmente se está investigando la incorporación de nuevos factores pronóstico en este tipo de modelo tales como el análisis citogenético por FISH, el estado mutacional de las cadenas pesadas de las Igs y la expresión del antígeno de superficie CD38 y la proteína ZAP-70 (Weinberg JB. y cols, 2.007; Letestu R. y cols, 2.010; Haferlach C. y cols, 2.010; Oliveira AC. y cols, 2.011; Bulian P. y cols 2.012).

Tabla 2. Propuesta de estratificación en grupos de riesgo según factores pronóstico (Montserrat E. Haematologica 2.001)

Parametros clásicos	BAJO RIESGO	ALTO RIESGO
Estadio Binet	A	B, C
Patrón M.O.	No difuso	Difuso
Morfología atípica	No	Si
TDL	>12m	\leq 12m
Parametros nuevos		
Marcadores séricos	Normales	Elevados
Citogenética	Normal, del13q aislada	Del11q, del17p
CD38	<30%	>30%
ZAP70	<20%	>20%
IgvVH	Mutado	No mutado

Tabla 3. Propuesta de estratificación en grupos de riesgo según factores pronóstico. Protocolo GCLLSG7/FCLLSG (Hallek M., Haematologica 2003).

Del 11q o 17p IgVH no mutado STK >10UI/L TDL ≤12m	BAJO RIESGO → <2 factores +	Observación
	ALTO RIESGO → ≥2 factores +	FCR/ Observación

Tabla 4. Propuesta de estratificación en grupos de riesgo según factores pronóstico. Protocolo Clínica Mayo (Kay NE. y Shanafelt T., Curr Hematol Malig Rep.2.007).

RIESGO	FISH	CD38	IgVH	ZAP70
BAJO	13q14-, normal	Negativo	Mutadas	Negativo
INTERMEDIO	12+, 6q21	Positivo	No-Mutadas	Positivo
ALTO	11q22-,17p13-	Positivo	No-Mutadas	Positivo

Fig12. Nomograma propuesto por Wierda W. y cols (Blood, 2.007).

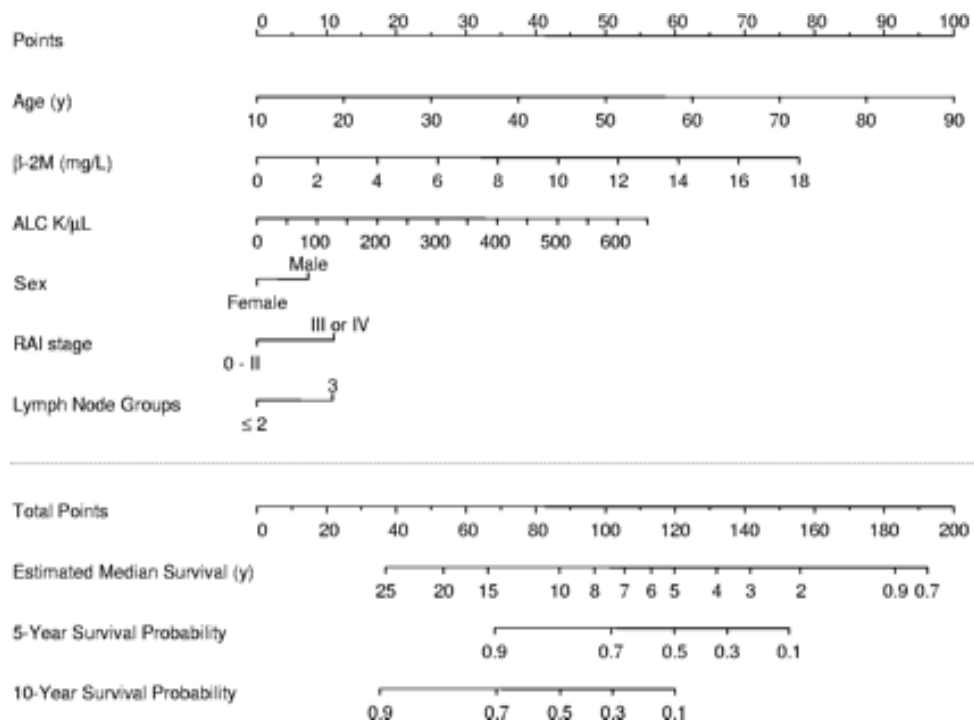


Tabla 5. Índice pronóstico basado en la presencia de factores de riesgo propuesto por Wierda W. y cols (Blood 2.007).

Características	Puntuación			
	0	1	2	3
Edad	—	< 50	50-65	> 65
β -2M, mg/L	< ULN	1-2 x ULN	> 2 x ULN	—
ALC, x 10 ⁹ /L	< 20	20-50	> 50	—
Sexo	Mujer	Hombre	—	—
Estadio Rai	0-II	III-IV	—	—
No. áreas linfoides	≤ 2	3	—	—

2.8. TRATAMIENTO.

El tradicional manejo de la LLC-B centrado en el principio de “*no perjudicar*” estaba basado en 2 pilares: primero los pacientes con LLC son mayoritariamente pacientes de edad avanzada y con frecuencia la causa de muerte es otra diferente a la enfermedad. En segundo lugar, el tratamiento hasta ahora no había conseguido prolongar la supervivencia en estos pacientes y la tasa de remisiones completas era baja. Como consecuencia del mejor entendimiento de la patogenia de la enfermedad, se han desarrollado en los últimos años un amplio número de esquemas de tratamiento, que producen remisión completa en casi el 50% de los pacientes y un tiempo libre de tratamiento de más de 5 años (O’Brien SM. y cols, 2.001a; Byrd JC. y cols, 2.003; Keating MJ. y cols, 2.003; Robak T. y cols, 2.006; Tam CS. y cols, 2.008; Hallek M. y cols, 2.009; Bosch F. y cols, 2.009; Knauf WU. y cols, 2.009).

En el momento actual, el tratamiento solo está justificado cuando existen síntomas debidos a la enfermedad o cuando ésta muestra signos de progresión. Es decir, debería plantearse la posibilidad de iniciar tratamiento ante las siguientes circunstancias (Cheson BD. y cols, 1.996; Hallek M. y cols, 2.008):

- Presencia de síntomas generales (fiebre, sudoración, pérdida de peso).
- Existencia de adenopatías o esplenomegalia de gran tamaño y que produzcan molestias.
- Infecciones de repetición con hipogammaglobulinemia.
- Descenso paulatino de la cifra de hemoglobina y plaquetas.

- Anemia hemolítica autoinmune.
- Tiempo de duplicación linfocitario rápido (< 12 meses).
- Estadio clínico avanzado.

Los objetivos del tratamiento deberían ser prolongar la supervivencia de los enfermos y mejorar su calidad de vida. Dado el curso tan heterogéneo de la enfermedad con una supervivencia muy variable, las decisiones terapéuticas deberían tomarse en función de los factores pronóstico y la edad del paciente. De hecho, se están realizando múltiples estudios (Shanafelt T. y cols, 2.009a; Molica S. y cols, 2.010; Bulian. P y cols, 2.010; Wierda W. y cols, 2.011) para desarrollar modelos que asocien factores pronóstico independientes con la variable tiempo hasta el primer tratamiento. Así se podrían identificar pacientes en los que, aún sin indicación terapéutica en el momento del diagnóstico, se pudiera acortar el tiempo hasta el inicio del tratamiento por cumplir criterios de alto riesgo de progresión de la enfermedad. El tratamiento estándar en pacientes en estadios precoces de la enfermedad (0, I y II de Rai sin enfermedad activa o A de Binet) consiste en “esperar y ver” mientras que en estadios avanzados (0, I y II de Rai con síntomas, III y IV de Rai, A y B de Binet con enfermedad activa, C de Binet) la combinación de fludarabina-ciclofosfamida-rituximab (FCR) es el tratamiento de primera elección exceptuando a los pacientes con una importante co-morbilidad o que presenten factores de mal pronóstico como la delección 17p o la mutación P53 (Eichhorst B. y cols, 2.011). Actualmente se distinguen 2 grupos de pacientes bien diferenciados a la hora de recibir tratamiento: aquellos que no presentan la del17p, P53 y/o la del11q y los que la presentan (NCCN – National Comprehensive Cancer Network – Guidelines, Versión 3.2011).

A continuación comentaremos someramente las distintas armas terapéuticas.

2.8.1. TRATAMIENTO QUIMIOTERAPICO.

Históricamente, el tratamiento de la LLC-B ha estado basado en agentes alquilantes, predominantemente clorambucil y en menor medida ciclofosfamida. También se han utilizado los corticoides bien en monoterapia o, de forma más frecuente en combinación con clorambucil pero su uso se ha asociado con una alta incidencia de infecciones (Hansen MM. y cols, 1.991).

El primer gran avance en el tratamiento de esta enfermedad fue el descubrimiento de la actividad de los análogos de las purinas: fludarabina monofosfato, 2-clorodesoxiadenosina (2-CDA) y pentostatina (DCM) (Keating MJ. y cols, 1.998; Dillman RO. y cols, 1.989). La eficacia del tratamiento con fludarabina y con 2-CDA fue rápidamente confirmada tanto en pacientes tratados como en los no tratados previamente. Una vez que la utilidad de estos fármacos fue demostrada empezaron a desarrollarse estudios comparativos. Así la fludarabina ha mejorado los resultados

obtenidos con regímenes clásicos como el esquema COP (ciclofosfamida, doxorubicina y prednisona) o el clorambucil, alcanzando una mayor tasa de remisión completa y duración de ésta (Dillman RO. y cols, 1.989; Rai K. y cols, 2.000). También se ha demostrado mayor actividad de 2-CDA asociado a prednisona frente a clorambucil más prednisona (Robak T. y cols, 2.000). Sin embargo, en ninguno de los estudios anteriormente mencionados se conseguía mejorar la supervivencia global. La conclusión de todos estos ensayos terapéuticos ha sido que los análogos de las purinas son los agentes más activos en la LLC, siendo el pilar para la elaboración de los nuevos esquemas de tratamiento.

El siguiente paso fue investigar combinaciones de fludarabina con otros citostáticos como ciclofosfamida y más recientemente fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone (O'Brien SM. y cols, 2.001a; Flinn IW. y cols, 2.000; Bosch F. y cols, 2.002). Estos agentes tienen mayor porcentaje de respuesta que administrados de forma única y parecen estar asociados a un mayor porcentaje de remisión completa que los análogos de las purinas administrados en monoterapia. En este sentido, las combinaciones con 2-clorodesoxiadenosina (2-CDA) han resultado igualmente efectivas cuando son usadas como primera línea de tratamiento para la LLC-B (Robak T. y cols, 2.006).

Más recientemente, otro fármaco como la bendamustina ha sido comparada con el clorambucil como tratamiento de primera línea, siendo la respuesta total y la supervivencia libre de progresión mayor con bendamustina (Knauf WU. y cols, 2.009), demostrando ser una buena alternativa terapéutica para aquellos pacientes que no pueden recibir fludarabina. En 2.008 la bendamustina fue aprobada por la FDA para el tratamiento de la LLC-B.

2.8.2. INMUNOTERAPIA.

El primer AcMo aprobado en el tratamiento del linfoma folicular fue el AcMo antiCD20 (*Rituximab*). Posteriormente empezó a usarse en terapia inmune en la LLC-B. Diversos estudios han demostrado que, aunque la expresión de CD20 con respecto al linfoma folicular sea baja en la LLC-B, el AcMo antiCD20 tiene beneficio terapéutico en esta enfermedad. Empleado como agente único induce generalmente una respuesta parcial (Itala M. y cols, 2.002; Hainsworth T. y cols, 2.003) por lo que se ha intentado utilizar una dosis más alta para superar a los inhibidores solubles de CD20 encontrados en el suero de estos pacientes (O'Brien SM. y cols, 2.001b; Manshour T. y cols, 2.003), incrementando la tasa de respuesta en un 40%. Sin embargo, la tasa de respuesta es aún mayor cuando se usa concomitantemente con otros agentes como fludarabina y ciclofosfamida (Byrd JC. y cols, 2.003).

El AcMo antiCD52 (Alemtuzumab) ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con LLC-B refractaria a drogas comunes como clorambucil o fludarabina (Rai K. y cols, 2.002). Este AcMo tiene una actividad significativa frente a células leucémicas en sangre periférica y médula ósea, pero parece menos efectivo en tejido linfoide secundario (Osterborg A. y cols, 2.002). De particular importancia resulta que este AcMo es eficaz en pacientes con alteraciones citogenéticas de mal pronóstico, especialmente en aquellos con delección 17p y/o mutación de P53, que típicamente son resistentes a diversos agentes citostáticos, de manera particular a los análogos de las purinas (Stilgenbauer S. y cols, 2.002). En un reciente estudio (Hillmen P. y cols, 2.007), alemtuzumab ha sido comparado con clorambucil como primera línea de tratamiento, obteniendo una tasa de respuesta total y remisión completa mayor, así como una supervivencia libre de progresión superior. Por estos resultados, este AcMo ha sido aprobado recientemente por la FDA como primera línea de tratamiento. Su principal inconveniente es la inmunosupresión que provoca y como consecuencia la significativa incidencia de infecciones oportunistas.

Otros agentes están siendo evaluados. Esto incluye AcMo o inmunotoxinas específicas para otros antígenos expresados por las células de la LLC-B, como por ejemplo CD23 (IDEC-152), HLA-DR (Hu1D10), CD25 (OTAK). AcMo radio-marcados, como es Zevalin (Yttrio-90-marcado-ibritumomab tiuxetan), también están siendo evaluados. Por último, la identificación de antígenos expresados por las células de la enfermedad podría permitir el desarrollo de vacunas, como en el caso de los linfomas foliculares, para inducir inmunidad activa antileucemia.

2.8.3. QUIMIOINMUNOTERAPIA.

El segundo gran avance en el tratamiento de la LLC ha sido la incorporación de los anticuerpos monoclonales a los esquemas con análogos de las purinas. Como hemos comentado previamente, estudios in vitro han demostrado que la utilización de *Rituximab* aumenta la actividad de agentes citostáticos como la fludarabina o ciclofosfamida (Demidem A. y cols, 1.997). También hay evidencia de que *Rituximab* regula a bcl-2 quizás por inhibición de IL10 (Alas S. y cols, 2.001). El grupo CALGB ha comparado simultáneamente la administración de *Rituximab* con fludarabina versus fludarabina seguido de *Rituximab*, objetivando una mayor tasa de respuesta en el uso simultáneo (Byrd JC. y cols, 2.003; Byrd JC. y cols, 2.005), aunque sin diferencias en la supervivencia global.

En un primer estudio no randomizado del MDACC, fludarabina y ciclofosfamida fueron combinadas con *Rituximab* dando lugar, al que posteriormente se convertiría en el esquema terapéutico por excelencia en la LLC, el esquema FCR. Al compararlo con controles históricos de la

misma institución, la tasa de respuesta global y la duración de ésta fue significativamente superior a la obtenida con la administración de fludarabina y ciclofosfamida (Keating MJ. y cols, 2.003). A raíz de este primer trabajo, nuestro grupo participó en el ensayo clínico CLL-8 diseñado por el Grupo Alemán para el estudio de LLC-B, comparando de manera prospectiva 2 grupos elegidos de forma randomizada: fludarabina – ciclofosfamida (FC) versus fludarabina – ciclofosfamida – Rituximab (FCR). Los resultados obtenidos han demostrado por primera vez la ventaja de la combinación de FCR respecto a un aumento en la supervivencia global (Tam CS. y cols, 2.008; Hallek M. y cols, 2.009). Lo que no ha conseguido mejorar el esquema FCR ha sido la supervivencia libre de progresión o la supervivencia global de los pacientes que presentan la delección 17p.

La combinación de fludarabina con alemtuzumab ha resultado viable y efectiva especialmente en pacientes con alteraciones de P53 (Elter T. y cols, 2.005). Actualmente está siendo estudiada la combinación FC más alemtuzumab (FCA), al igual que se está realizando un estudio comparativo entre FC y FCA en primera línea en pacientes de alto riesgo.

Otras alternativas que están siendo estudiadas son la combinación de FCR más alemtuzumab en pacientes de alto riesgo, la sustitución de fludarabina por pentostatina en el esquema FCR (PCR) para reducir mielotoxicidad, bendamustina combinada con rituximab (BR), 2-CDA con rituximab, metilprednisolona más rituximab seguido de alemtuzumab o rituximab más alemtuzumab, lumiliximab (AcMo anti-CD23) más FCR. Hasta el momento, ninguna de ellas resulta tan eficaz al comparar con FCR.

2.8.4. TRASPLANTE DE MEDULA OSEA.

Debido a que la LLC-B es una enfermedad incurable con los tratamientos convencionales, existe un interés cada vez mayor en la posible utilidad de los trasplantes de precursores hematopoyéticos en el tratamiento de la misma.

En referencia al trasplante autólogo, la mortalidad directamente ligada al procedimiento es inferior al 10% pero lamentablemente, la tasa de recaída es muy elevada (el 50% a los 5 años del trasplante), aunque la supervivencia libre de enfermedad podría verse incrementada en algunos enfermos seleccionados. A la luz de los buenos resultados obtenidos con regímenes de inmunoterapia como FCR, su indicación ha quedado en segundo plano.

Con respecto a los trasplantes alogénicos, la mortalidad ligada al procedimiento es del 30-50%. Sin embargo la tasa de recaída es baja (10-15%) y alrededor de un 40% de los enfermos disfrutan de una remisión mantenida, probablemente en relación con el efecto injerto contra tumor

(Schetelig J. y cols, 2.003). Dada la alta mortalidad de éste procedimiento y a la edad avanzada de los enfermos es de gran interés la utilización de regímenes no totalmente mieloablativos (mini-trasplantes o trasplantes alogénicos de intensidad reducida) con el fin de reducir la mortalidad peri-trasplante y aumentar el límite de edad de los enfermos que se puedan trasplantar (Khoury I. y cols, 2.000; Khoury I. y cols, 2.002).

Según las recientes recomendaciones del grupo EBMT, el trasplante alogénico sería ofrecido a aquellos pacientes con un buen estado general que presentaran una enfermedad refractaria o la delección 17p (Dreger P. y cols, 2.007).

HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

3. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente nuestro grupo ha decidido realizar el estudio de un grupo de pacientes diagnosticado de leucemia linfática crónica B en diversos hospitales de la región, en un intento de estratificar subgrupos de pacientes en base a parámetros biológicos fácilmente medibles como: datos de hemograma y bioquímica, hallazgos cito-histológicos, inmunofenotípicos y genéticos. Así, los objetivos de esta tesis serían:

1. Evaluación completa de todos los datos del paciente, que incluiría:
 - Datos clínicos: sexo, edad, presencia de adenopatías, hepatomegalia y/o esplenomegalia y el estadio clínico.
 - Datos biológicos: hemograma, bioquímica (función renal, hepática, iones, VSG, LDH, PCR, β 2-microglobulina, TCD, PT, albúmina, Igs, proteinograma) y tiempo de doblaje linfocitario.
 - Inmunofenotipo de sangre periférica o médula ósea. Determinación del *score* inmunofenotípico y otros antígenos, incluido el CD38 y ZAP70.
 - Citogenética, tanto la obtenida por métodos convencionales como por técnicas de hibridación in situ (FISH) al diagnóstico y en momentos posteriores. Recogida de nuevas alteraciones citogenéticas en el curso de la enfermedad (evolución clonal).
 - Datos cito-histológicos: patrones de infiltración ósea (nodular, intersticial, nódulo-intersticial y difuso).
2. Evaluar la relación de la información anterior con la evolución clínica de la enfermedad (estatus vital y supervivencia, necesidad de recibir tratamiento, tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad al inicio del primer tratamiento y número de líneas recibidas).
3. Analizar la LBM de nuestra serie una vez reclasificados los antiguos estadios 0 de RAI según los nuevos criterios del NCI-WG/IWCLL (Hallek M. y cols, 2.008), establecer el umbral linfocitario en nuestra población que prediga el riesgo de transformación de LBM en una enfermedad activa y evaluar la relación de factores pronóstico clínicos y biológicos al diagnóstico de la LBM con su evolución.
4. Analizar los factores pronóstico de supervivencia y construir un nomograma e índice pronóstico a raíz del estudio de las características clínico-biológicas de éstos pacientes diagnosticados de LLC-B en nuestro medio. Por último, analizar la concordancia del nomograma e IP de Wierda y colaboradores del MDACC con la supervivencia de nuestra serie.

MATERIAL Y METODOS

4. MATERIAL Y METODOS.

4.1. SUJETOS DEL ESTUDIO.

Se incluyeron en el estudio 303 pacientes adultos diagnosticados de leucemia linfática crónica B entre los años 1.991 y Diciembre del 2.009 en el Hospital General Universitario Morales Meseguer. A partir del año 2.003 también se incluyeron pacientes procedentes de diversos hospitales de la Comunidad Autónoma de Murcia (Hospital Rafael Méndez de Lorca, Hospital Los Arcos de Santiago de la Ribera, Hospital del Noroeste de Caravaca, Hospital Nuestra Señora del Rosell de Cartagena y Hospital de Cieza).

El diagnóstico de LLC-B requirió la presencia de linfocitosis persistente junto a un inmunofenotipo en sangre periférica y/o médula ósea compatible según las “Guidelines” del NCI-WG (Cheson BD. y cols, Blood, 1.996).

4.1.1. DATOS CLINICOS RELACIONADOS CON LOS PACIENTES.

En el momento del diagnóstico se evaluó:

- Sexo y edad.
- Presencia de adenopatías y/ o hepato-esplenomegalia.
- Estadio clínico según las clasificaciones de Rai y Binet.

Además se recabó información sobre:

- Tratamiento, fecha de inicio de éste y número de líneas de tratamiento recibidas a lo largo de la evolución de la enfermedad.
- Supervivencia.

4.1.2. DATOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS CON LOS PACIENTES.

- Cifra de hemoglobina, leucocitos, linfocitos y plaquetas en el momento del diagnóstico.
- Tiempo de doblaje linfocitario.
- Creatinina, urato, bilirrubina total y directa, FA, LDH, VSG, PCR, β 2-microglobulina, proteínas totales, albúmina, IgG, IgA, IgM y proteinograma.
- Test de Coombs directo.
- Patrón de infiltración en la biopsia ósea.

- Estudio citogenético: citogenética convencional y FISH, tanto en el momento del diagnóstico como a lo largo de la evolución de la enfermedad.

4.2. ESTUDIO INMUNOFENOTIPICO.

El estudio inmunofenotípico se realizó indistintamente en sangre periférica y/ o médula ósea en el momento del diagnóstico. Se analizó, en primer lugar el *score* inmunofenotípico (n = 268) según la propuesta del grupo de Matutes (1994) con la determinación de la intensidad y porcentaje de expresión de los antígenos de superficie CD5, CD22, CD23, CD79b, FMC7 e inmunoglobulinas de superficie. En segundo lugar se determinó la intensidad y porcentaje de expresión del antígeno de superficie CD38, estableciendo en nuestro laboratorio el punto de corte en un 20%. En Enero del año 2.004 se inició la determinación de la proteína tirosin-kinasa ZAP70 mediante citometría de flujo según la técnica descrita por Crespo y cols (The New England Journal of Medicine 2.003).

Todos los datos (clínicos, biológicos, inmunofenotipo y citogenética) al igual que los tratamientos recibidos fueron recogidos en el protocolo que se expone a continuación.

4.3. PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS.

DEMOGRAFICOS

Hospital de referencia: __

Nº SS: _____ Nº Historia Clínica: _____

Nombre: _____

Fecha de nacimiento: __/__/__

Fecha diagnóstico: __/__/__ Edad al diagnóstico: __

CLINICA Y EXPLORACION FISICA

Motivo de diagnóstico: _

Adenopatías o visceromegalias: Si / No Nº de áreas afectadas: _____

¿Cuales? _____

Estadio clínico (Rai/Binet): ____/____ ECOG: ____

HEMOGRAMA

WBC x 10⁹/L: _____ Leucocitos (____S, ____L, ____M, ____Eo)

HB (gr): ____ Plaquetas x 10⁹/L: _____

Tiempo de duplicación de cifra de linfocitos: _____ meses.

MORFOLOGÍA (*)

Frotis: _____

AMO (___/___/___): Infiltración: ___ %. Serie eritroide: ___ %; serie mieloide: ___ %.

Patrón de infiltración de la biopsia ósea (___/___/___): _____

BIOLOGIA

Creatinina: ____, Ac. Úrico: ____, Calcio: ____, BT: ____, BI: ____, GPT: ____, FA: ____,

LDH: ____, PT: ____, Alb: ____, IgG: ____, IgA: ____, IgM: ____

Proteinograma _____ PCR: _____,

VSG: ____, B2M: ____, TCD: ____

ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO (*)Fecha: ___/___/___ Médula ósea Sangre periférica

CD5: ___% (); CD19: ___% (); CD20: ___% (); CD22: ___% ();

CD23: ___% (); CD25: ___% (); CD38: ___% (); CD44: ___% (); CD45:

___% (); CD79b: ___% (); FMC7: ___% (); ZAP70: ___% ()

Monoclonalidad: Kappa / Lambda _____**SCORE INMUNOFENOTÍPICO (*)**

Puntuación: ____

ESTUDIO CITOGENETICO (*)

Fecha: ___/___/___

Cariotipo: _____

FISH _____

EVOLUCION Y TRATAMIENTOTratamiento: Si No **1ª línea de tto**

Motivo: _____

- Linfocitosis progresiva (>50%) en 2 meses o doblaje en 6 meses - Aumento de adenopatías - Síntomas B - Anemia/ trombocitopenia autoinmune - Insuficiencia medular - Esplénomegalia gigante **Esquema:**- Clorambucil Fecha de inicio: ___/___/___ Fecha de terminación: ___/___/___- Fludarabina - Fluda + Cf - FMC

- Fluda + AntiCD20

- Fluda + AntiCD52
- AntiCD20 + AntiCD52
- 2-CDA
- MiniCHOP

Reevaluación tras tto:

Respuesta: _____

2ª línea de tto

Motivo: _____

Esquema:

- Clorambucil Fecha de inicio: __/__/__ Fecha de terminación: __/__/__
- Fludarabina
- Fluda + Cf
- FMC
- Fluda + AntiCD20
- Fluda + AntiCD52
- AntiCD20 + AntiCD52
- 2-CDA
- MiniCHOP
- Trasplante de m. ósea: Autologo Alogénico Mini-Ali Fecha: __/__/__

Reevaluación tras tto:

Respuesta: _____

3ª línea de tto

Motivo: _____

Esquema:

- Clorambucil Fecha de inicio: __/__/__ Fecha de terminación: __/__/__
- Fludarabina
- Fluda + Cf
- FMC
- Fluda + AntiCD20
- Fluda + AntiCD52
- AntiCD20 + AntiCD52
- 2-CDA
- MiniCHOP
- Trasplante de m. ósea: Autólogo Alogénico Mini-Alo Fecha: __/__/__

Reevaluación tras tto:

Respuesta: _____

NOTA IMPORTANTE: (*) A RELLENAR POR SECCION DE CITOLOGIA DEL H.M.M.

NOTAS

4.4. ANALISIS ESTADISTICO.

El análisis estadístico se realizó a través del programa Statistical Package for the Social Science (SPSS), versión 18.0 para sistema operativo Windows (Chicago, Illinois, EEUU).

4.4.1. ANALISIS UNIVARIANTE.

El estudio descriptivo de las variables cualitativas se realizó mediante el cálculo de la frecuencia absoluta y frecuencia relativa en porcentajes, siendo representado gráficamente en sistema de sectores o diagrama de barras. Para el estudio del ajuste a una distribución normal de las variables cuantitativas, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables continuas fueron representadas como media \pm desviación estándar (DE) ó mediana y rango intercuartílico. La correlación entre 2 variables continuas se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Las variables categóricas fueron comparadas mediante el test de la chi-cuadrado y utilizamos la U de Mann-Whitney para comparar aquellas variables que no seguían una distribución normal. Las tasas de supervivencia libre de evento fueron calculadas utilizando el método de Kaplan Meier, y las diferencias al comparar grupos se determinaron mediante el log rank test. Estos resultados se representan gráficamente mediante curvas de supervivencia.

4.4.2. ANALISIS MULTIVARIANTE.

El efecto independiente de las variables en el pronóstico se calculó usando el modelo de regresión multivariante de riesgos proporcionales de Cox, incluyendo en el modelo aquellas variables tanto clínicas como de laboratorio que mostraron un valor de $p < 0.05$ en el análisis univariante, y calculando la razón de riesgo (HR) y el intervalo de confianza al 95%.

Desarrollamos un índice pronóstico asignando a cada variable que mostró su significación pronóstica de manera independiente una puntuación proporcional a su coeficiente de regresión.

Para la construcción del nomograma e índice pronóstico se utilizó el modelo cox bi y multivariante con modelización stepwise (hacia atrás condicionada) siguiendo la metodología

descrita para la generación de nomogramas (Iasonos A. y cols, 2.008). Debido al relativamente pequeño tamaño de la muestra en la modelización Cox multivariante, los niveles de significación de las variables se extendieron a un límite de significación de 0,2.

Para la validación del nomograma se estableció un coeficiente de concordancia (CC) y por remuestreo Jackknife se obtuvo un estimador no sesgado del mismo.

RESULTADOS

5. RESULTADOS.

5.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

Como ya expusimos en el apartado anterior, se seleccionaron 303 pacientes diagnosticados de leucemia linfática crónica B durante 1.991 y Diciembre del 2.009.

5.1.1. Análisis descriptivo de las variables cualitativas.

En la Tabla 6 se exponen las características generales de los 303 pacientes incluidos en el estudio.

De los 303 pacientes, el 55.4% fueron varones frente a un 44.6% de mujeres (Fig. 13). La media de edad al diagnóstico fue 68 años (rango: 32-95 años). El mayor porcentaje de pacientes (66.3%) tenía más de 65 años, frente a un 25.7% que estaba entre 50 y 65 años, y un 7.9% que presentaba menos de 50 años (Fig. 14). El 82.5% de los casos fueron diagnosticados de forma casual, frente a un 7.3% a raíz de la aparición de adenopatías, un 1.3% que consultó por anemia y un 8.9% por otras causas (infecciones, hemorragias...). Los pacientes fueron estadiados de acuerdo a las clasificaciones de Rai y Binet (Fig. 15, 16, 17, 18 y 19).

La cifra de β 2-microglobulina, el test de Coombs directo y el proteinograma se determinaron en el 84.8%, 83.2% y 96.7% respectivamente (Fig. 20, 21 y 22).

El *score* inmunofenotípico según la propuesta del grupo de Matutes se determinó en el 88.8% de los pacientes (Fig.23). La determinación del antígeno de superficie CD38 se realizó en el 87.1% de los pacientes. En función de la expresión de este antígeno, se identificaron dos grupos: CD38+ y CD38-, habiéndose establecido el punto de corte en un 20% en nuestra serie. El porcentaje de pacientes CD38+ fue de un 37.9% frente a un 62.1% de pacientes CD38- (Tabla 7) (Fig. 24). En Enero del año 2.004 iniciamos en nuestro laboratorio la determinación de la proteína tirosin-kinasa ZAP70 mediante citometría de flujo, siendo realizada en el 65% de los pacientes. También se establecieron 2 grupos: ZAP70+ y ZAP70- (punto de corte: 20%) (Tabla 8) (Fig. 25).

El aspirado medular se realizó en el 99.7% de los pacientes, sin embargo solo en el 58.7% de los mismos se pudo llevar a cabo una biopsia ósea (Fig. 26). El estudio citogenético por la técnica convencional se llevó a cabo en el 51.2% de los pacientes, objetivando alteraciones cromosómicas en el 29.7% de éstos. La alteración citogenética más frecuente fue la trisomía 12, seguida de la deleción 13. En el mismo porcentaje de los casos se realizó la técnica de hibridación

in situ (FISH), objetivando alteraciones cromosómicas en el 42.6% de los casos. La delección 13q fue la anomalía cromosómica aislada más frecuente detectada por FISH, seguida de la trisomía 12 y de la delección 11q. La delección 13q fue la anomalía que con más frecuencia se encontró asociada a otras alteraciones. En la Tabla 9 se exponen las alteraciones cromosómicas halladas en nuestra serie por FISH. En cuanto al fenómeno de evolución clonal, lo detectamos en el 47.7% de los 88 pacientes en los que se había llevado a cabo el estudio citogenético en distintos momentos de la evolución de la enfermedad (Fig.27).

Respecto al tratamiento, durante el periodo de seguimiento, el 50.8% de los pacientes no lo precisaron a lo largo de la evolución de la enfermedad frente a un 49.2% que sí (la media de seguimiento fue de 68.37 meses, la mediana de 62 meses) (Fig.28). La media de meses transcurridos desde el diagnóstico de la enfermedad hasta el inicio del primer tratamiento en aquellos que lo precisaron fue de 27.63 meses. También se observó que de los pacientes que recibieron tratamiento, aproximadamente 1/3 (32.9%) necesitó más de tres líneas de quimioterapia. El tratamiento más utilizado fueron los alquilantes, fundamentalmente el clorambucil, seguido de los esquemas que incluían fludarabina (Tabla 10). De los pacientes que recibieron tratamiento, el 40.3% recibieron fludarabina frente a un 59.7% que no la recibió. Solo 6 pacientes de toda la serie, menores de 60 años, fueron sometidos a trasplante de PHSP, un autólogo, cinco alogénicos (3 de ellos de intensidad reducida) y un trasplante de cordón.

Con una mediana de seguimiento de 62 meses, excluyendo 35 casos en los que se ha perdido el seguimiento, el 71.64% de los pacientes están vivos frente a un 28.36% que han fallecido a lo largo del periodo de seguimiento del estudio (Fig. 29), siendo la principal causa de muerte la sepsis (37.9%; 28/75, 5 de ellos con neumonía y 2 con infección por CMV) así como otros eventos ajenos a la propia enfermedad (27%; 20/75), seguidas de progresión de la enfermedad (17.6%; 13/75) y segundas neoplasias (17.6%; 13/75). Las segundas neoplasias (incluyendo tumores sólidos y hematológicos) se presentaron en 68 pacientes (22.4%), siendo los más frecuentes los tumores cutáneos (28.4%; 19/68) seguidos de los linfomas (14.9%; 10/68, 3 de ellos Síndrome de Richter). Dentro de las neoplasias hematológicas (17/68) las más frecuentes fueron los linfomas (10/17), seguidas de síndromes mielodisplásicos-mieloproliferativos (4/17) y gammapatías monoclonales (3/17, cumpliendo 2 de ellos criterios de mieloma múltiple). Destacar que en el grupo de pacientes menores de 50 años, la supervivencia hasta el cierre del estudio era del 95.8%. En el seguimiento de los pacientes se analizó la supervivencia acumulada, en meses, desde el momento del diagnóstico hasta el fallecimiento del enfermo o la fecha de cierre del estudio (Diciembre'09) siendo de un 74.9%.

Tabla 6. Características generales de la cohorte de sujetos incluidos en nuestra serie.

Variable	N	%
Edad		
< 50 años	24/303	7.9
50-65 años	78/303	25.7
>65 años	201/303	66.3
Sexo		
Varón	168/303	55.4
Mujer	135/303	44.6
Adenopatías		
No	181/303	59.7
Menos de 3	79/303	26.1
3 o más de 3	43/303	14.2
Esplenomegalia		
No	266/303	87.8
Si	37/303	12.2
Hepatomegalia		
No	281/303	92.7
Si	22/303	7.3
Estadio (Rai)		
0	166/303	54.8
I	77/303	25.4
II	34/303	11.2
III	13/303	4.3
IV	13/303	4.3
Estadio (Binet)		
A	238/303	78.5
B	39/303	12.9
C	26/303	8.6
β 2microglobulina		
<4 mg/ L	212/257	82.5
>4 mg/ L	45/257	17.5

Tabla 6. Características generales de la cohorte de sujetos incluidos en nuestra serie.

Variable	N	%
TCD		
Negativo	239/252	94.8
Positivo	13/252	5.2
TDL		
No alcanzado	137/265	51.7
Alcanzado	128/265	48.3
Proteinograma		
Normal	235/293	80.2
Monoclonal	17/293	5.8
Hipogammaglobulinemia	45/293	14
Score IF (Matutes)		
1	1/269	0.4
2	13/269	4.8
3	40/269	14.9
4	67/269	24.9
5	109/269	40.5
6	39/269	14.5
Patrón de infiltración ósea		
Nodular	19/178	10.7
Nódulo-intersticial	88/178	49.4
Intersticial	23/178	12.9
Difuso	30/178	16.9
Normal	18/178	10.1
Citogenética convencional		
Normal	109/155	70.3
Anómala	46/155	29.7
FISH		
Normal	89/155	57.4
Anómalo	66/155	42.6

Tabla 6. Características generales de la cohorte de sujetos incluidos en nuestra serie.

Variable	N	%
Tratamiento		
No	154/303	50.8
Si	149/303	49.2
Estatus vital		
Vivo	192/268	71.64
Muerto	76/268	28.36

Figura 13. Distribución por sexo.

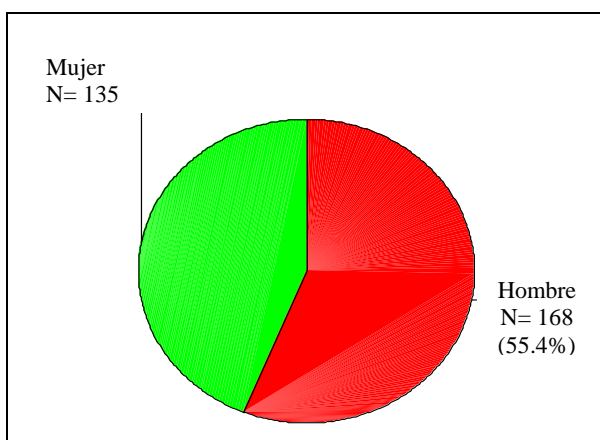


Figura 14. Distribución por edad.

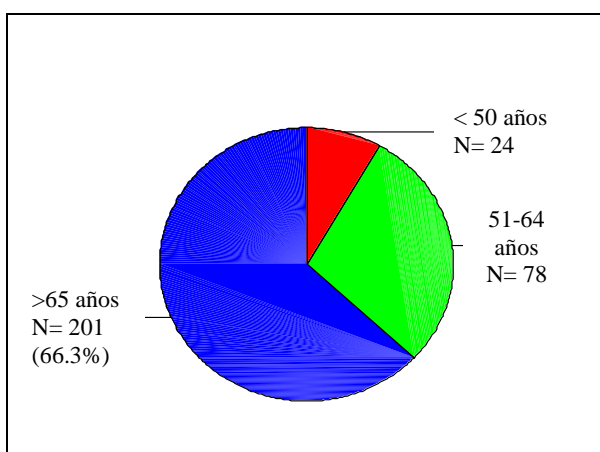


Figura 15. Distribución por adenopatías.

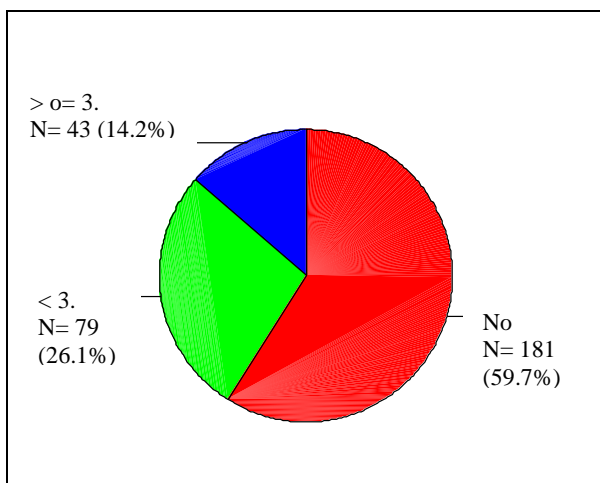


Figura 16. Distribución por esplenomegalia.

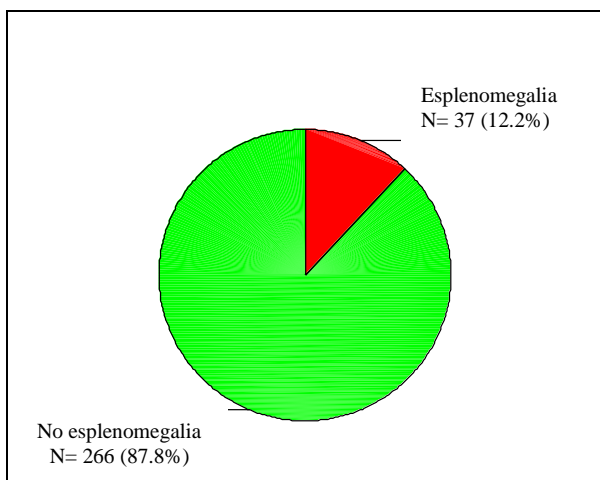


Figura 17. Distribución por hepatomegalia.

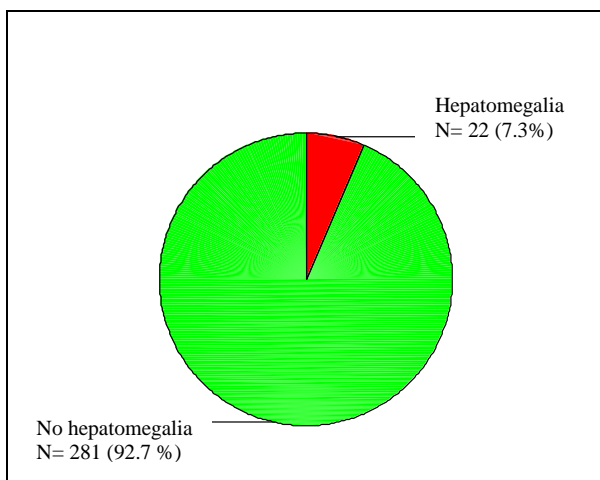


Figura 18. Distribución por estadio según la clasificación de Rai.

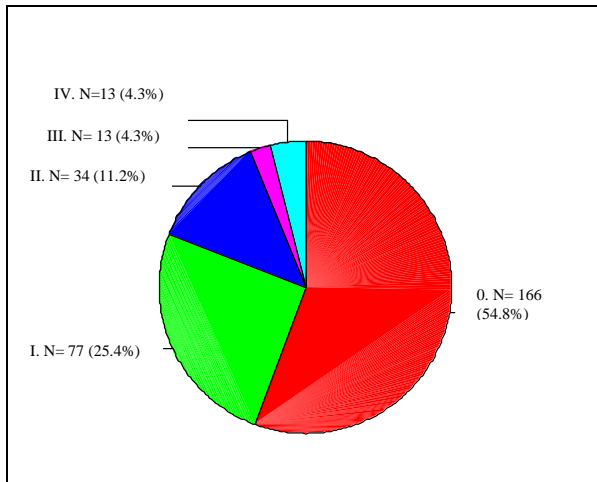


Figura 19. Distribución por estadio según la clasificación de Binet.

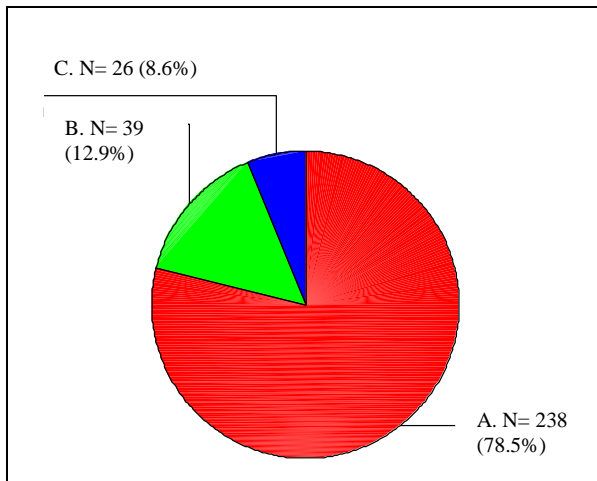


Figura 20. Distribución por $\beta 2$ -microglobulina.

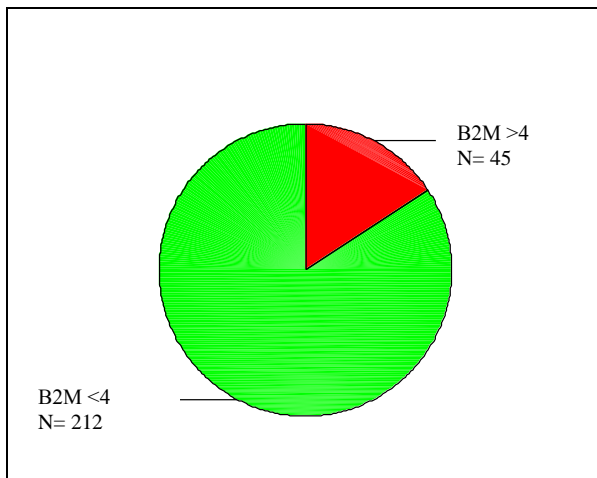


Figura 21. Distribución por Test de Coombs directo.

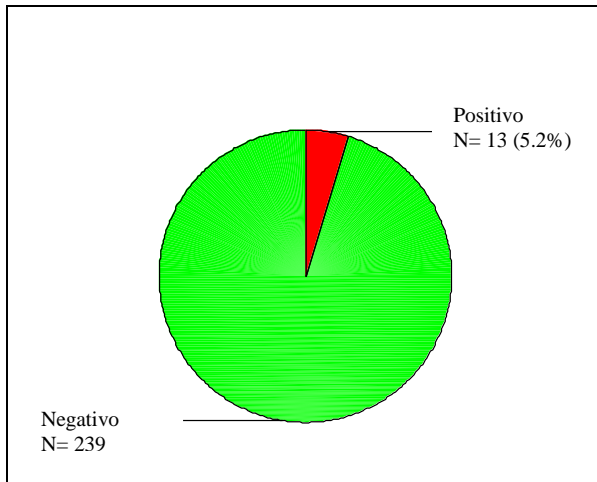


Figura 22. Distribución por características del proteinograma.

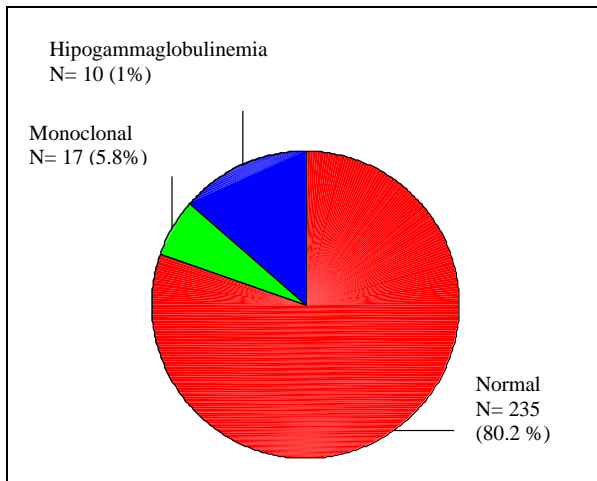


Figura 23. Distribución por *score* inmunofenotípico.

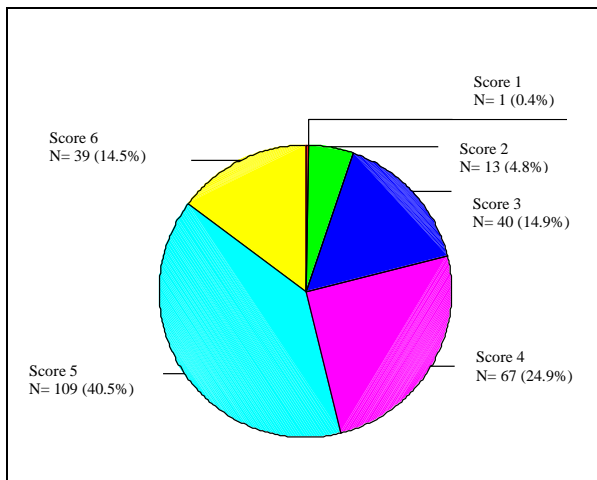


Tabla 7. Identificación de 2 subgrupos en función de la expresión de CD38 en la población de nuestro estudio.

CD38	n	%
Negativo	164	62.1
Positivo	100	37.9

Tabla 8. Identificación de 2 subgrupos en función de la expresión de ZAP70 en la población de nuestro estudio.

ZAP70	n	%
Negativo	97	49.2
Positivo	100	50.8

Figura 24. Distribución por la expresión del antígeno CD38.

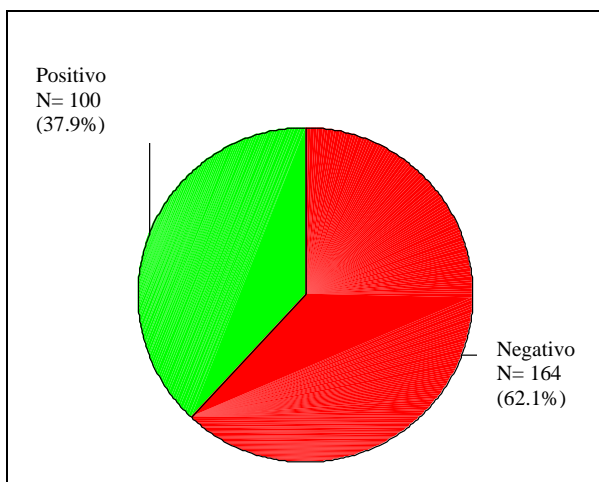


Figura 25. Distribución por la expresión de la proteína ZAP70.

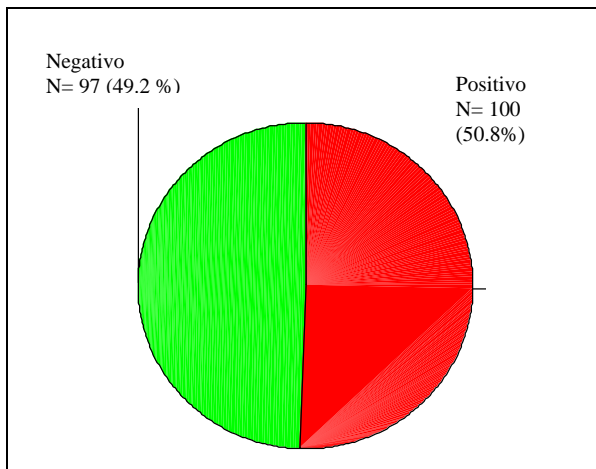


Figura 26. Distribución por el patrón de biopsia ósea.

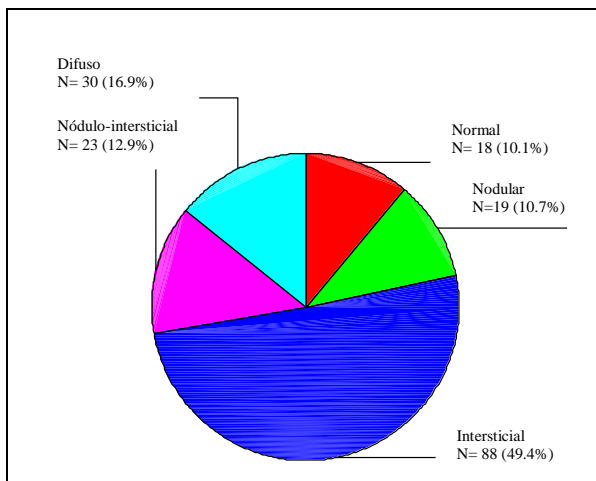


Figura 27. Distribución por evolución clonal.

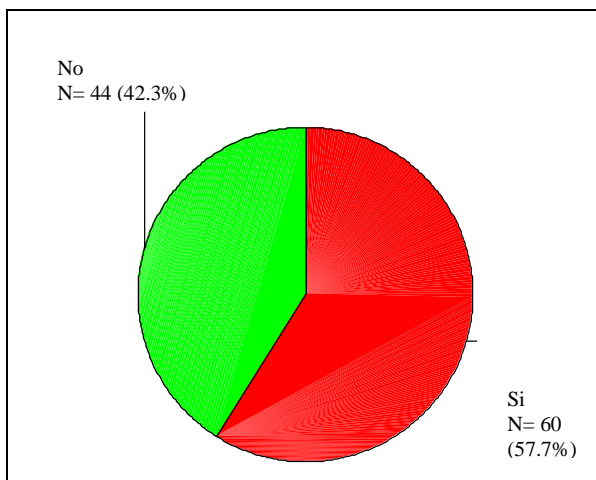


Tabla 9. Alteraciones cromosómicas por orden de frecuencia determinadas por FISH en nuestra serie.

	N= 66	%
Del 13q	30	45.5
+12	19	28.8
Del 13q, del 11q	6	9.1
Del 11q	3	4.5
Del 11q, +12	2	3
Del 13q, del 17p	2	3
Del 6q	1	1.5
Del 17p	1	1.5
Del 13q, del 6q	1	1.5
Del 11q, del 17p	1	1.5

Figura 28. Distribución en función del tratamiento.

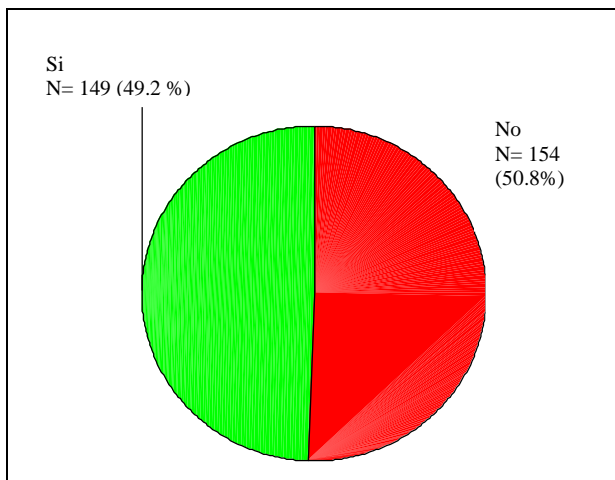
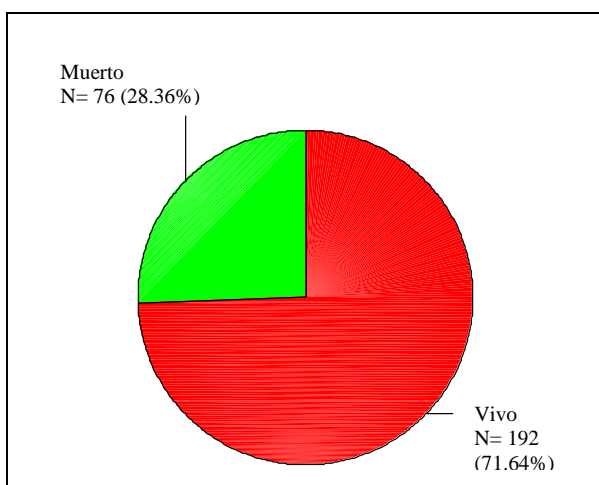


Tabla 10. Tratamiento recibido en la población de nuestro estudio.

Tratamiento	n	%
Alquilantes	72	53.3
Esquemas con fludarabina	43	31.9
Poliquimioterapia	14	10.4
Pentostatina o Bendamustina	6	4.4

- Alquilantes: clorambucil v.o., ciclofosfamida v.o.
- Poliquimioterapia: CHOP, COP,...

Figura 29. Distribución por estatus vital.



5.1.2. Análisis descriptivo de las variables cuantitativas.

En la Tabla 11 se expone el análisis descriptivo de las variables cuantitativas de los 303 pacientes incluidos en el estudio. La mediana de edad al diagnóstico fue de 69 años (rango: 32-95 años). La mediana de meses de seguimiento fue de 62 meses (rango: 1-338 meses).

Tabla 11. Análisis descriptivo de las variables cuantitativas.

Variable	Mediana (rango intercuartílico)
Edad (años)	69 (61-76)
Hemoglobina (g/dL)	13.9 (12.8-14.7)
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	17.500 (12.600-30.900)
Neutrofilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4.060 (3.200-5.193)
Linfocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11.996 (7.600-20.900)
Monocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	700 (500-1.000)
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	195 (100-220)
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	190 (154-225)
Creatinina (mg/dl)	1 (0.86-1.17)
Acido úrico (mg/dl)	5.8 (4.81-6.9)
Ca (mg/dl)	9.3 (9-9.7)
BT (mg/dl)	0.6 (0.5-0.8)
BD (mg/dl)	0.2 (0.13-0.47)
GPT (u.int/L)	20 (15-25.25)
LDH (u.int/L)	324 (266-390)
FA (u.int/L)	174 (131-212)
Proteínas totales (g/L)	69 (66-73)
Albúmina (g/L)	44 (41-46)
IgG (mg/L)	880 (710.75-1070)
IgA (mg/L)	167 (114-246.5)
IgM (mg/L)	60 (38-100)
$\beta 2$ -microglobulina (mg/L)	2348 (1800-3249.5)
VSG (mm/h)	12 (5-24.75)
PCR (mg/L)	5 (3-5)
TDL (meses)	21 (8-40)
% Linfocitos patológicos	44 (27-62)
Nº de meses de seguimiento	62 (30-96)
Nº de meses desde el diagnóstico al primer tratamiento	14.5 (1-40.5)
Nº de líneas de tratamiento	2 (1-3)

Figura 30. Histograma de edades (p: 0.121).

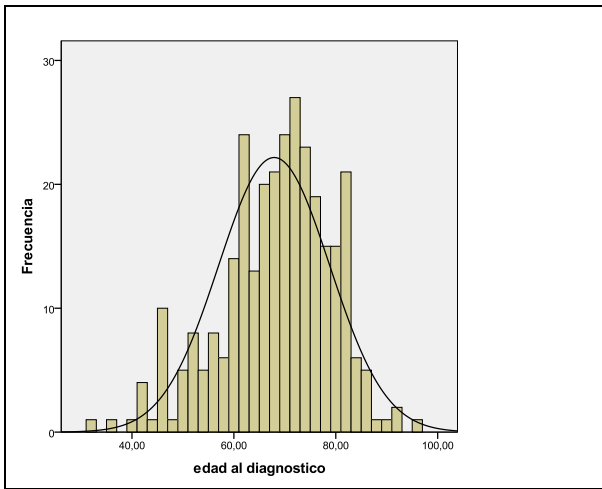


Figura 31. Histograma de hemoglobina (p = 0.001).

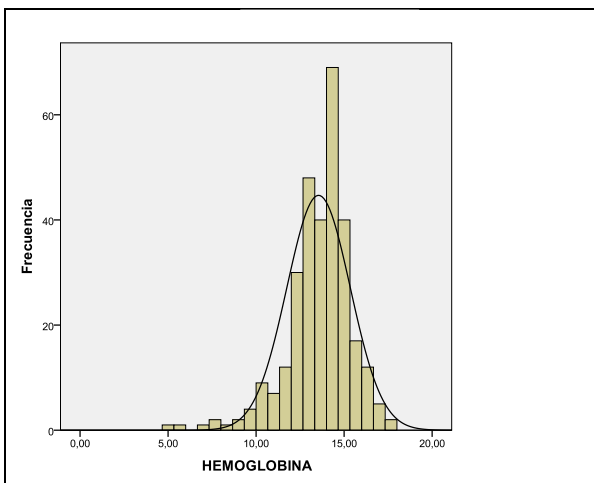


Figura 32. Histograma de leucocitos (p = 0.0001).

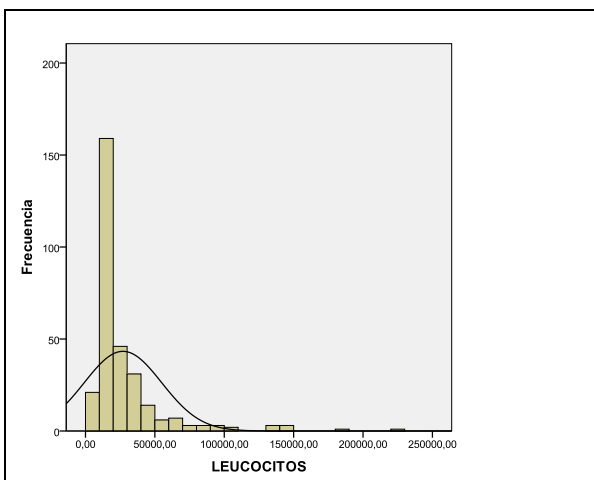


Figura 33. Histograma de neutrófilos ($p = 0.0001$).

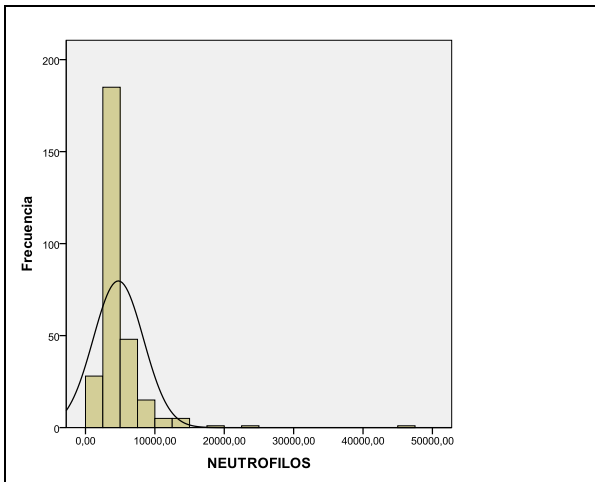


Figura 34. Histograma de linfocitos ($p = 0.0001$).

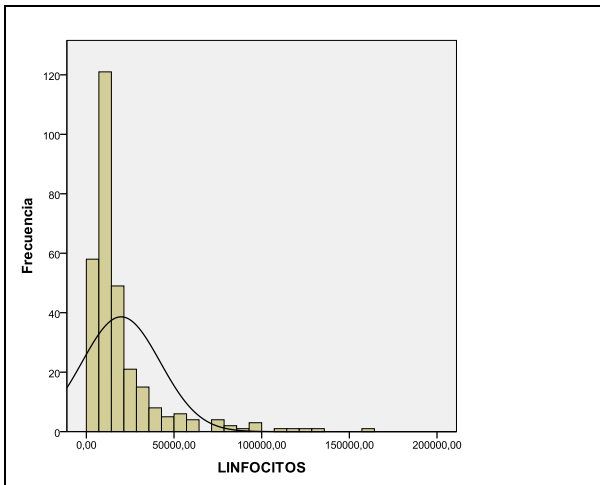


Figura 35. Histograma de monocitos ($p = 0.0001$).

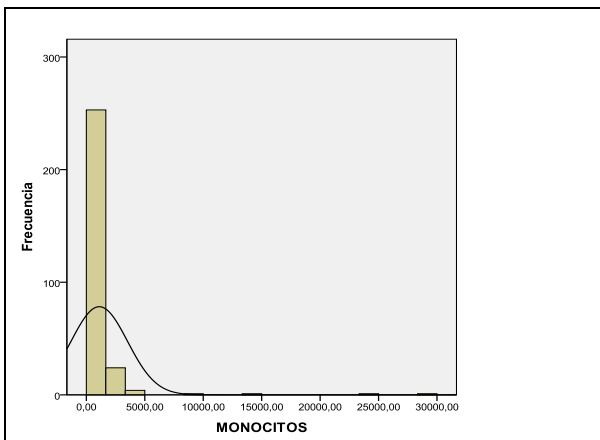


Figura 36. Histograma de eosinófilos ($p = 0.0001$).

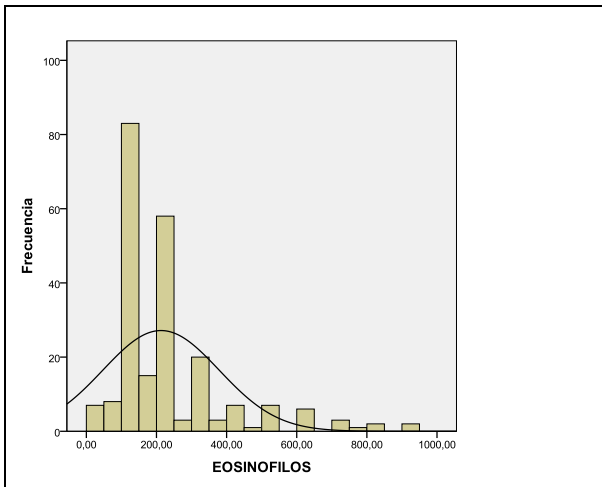


Figura 37. Histograma de plaquetas ($p = 0.002$).

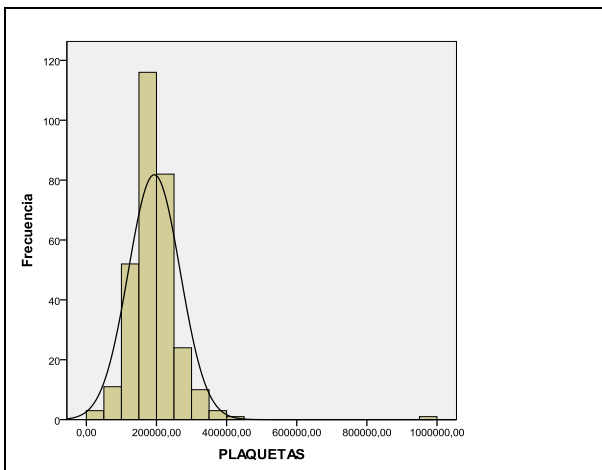


Figura 38. Histograma de creatinina ($p = 0.001$).

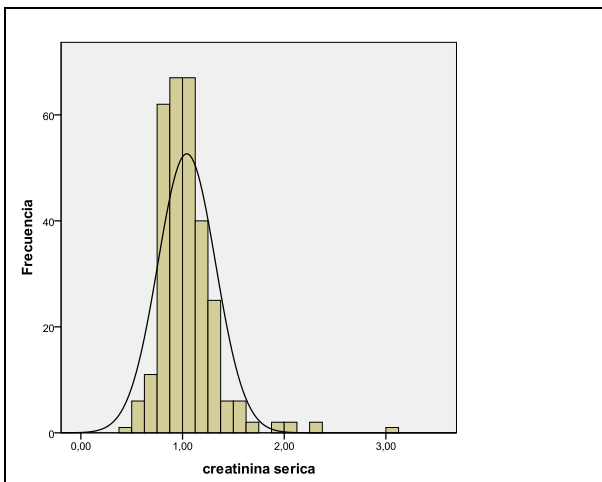


Figura 39. Histograma de acido úrico ($p = 0.212$).

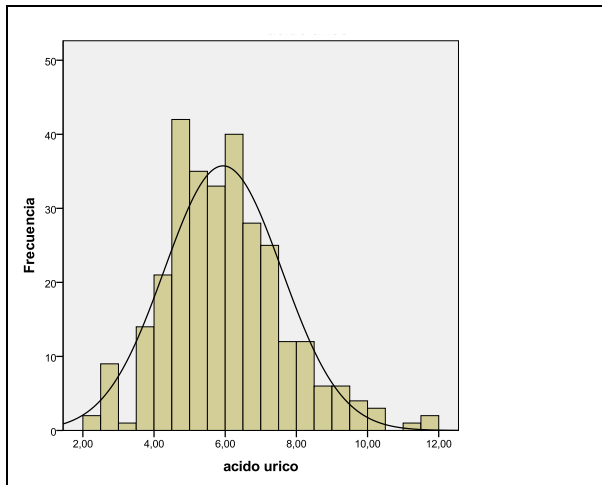


Figura 40. Histograma de calcio ($p = 0.034$).

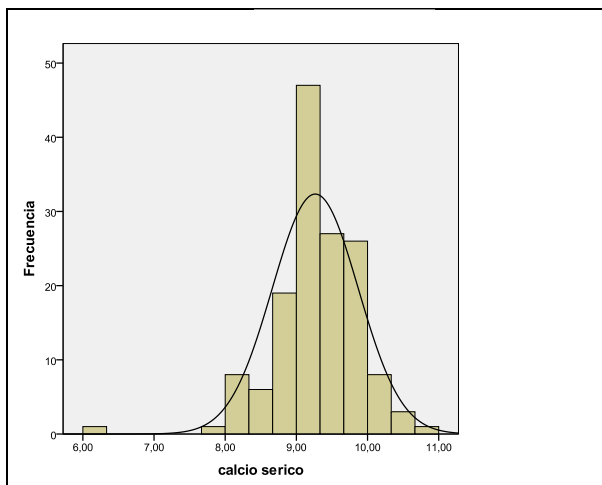


Figura 41. Histograma de BT ($p = 0.0001$).

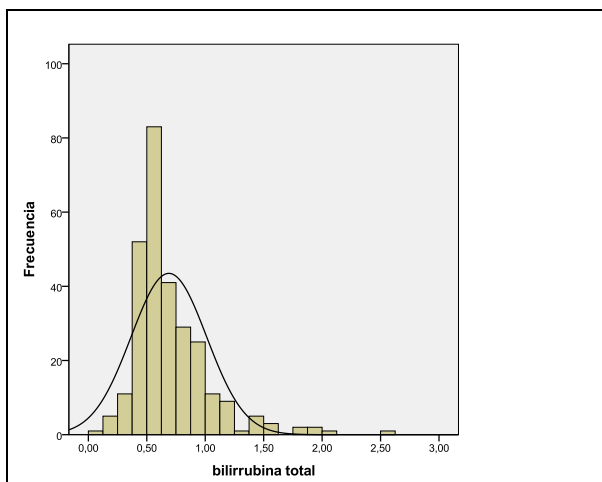


Figura 42. Histograma de BD ($p = 0.028$).

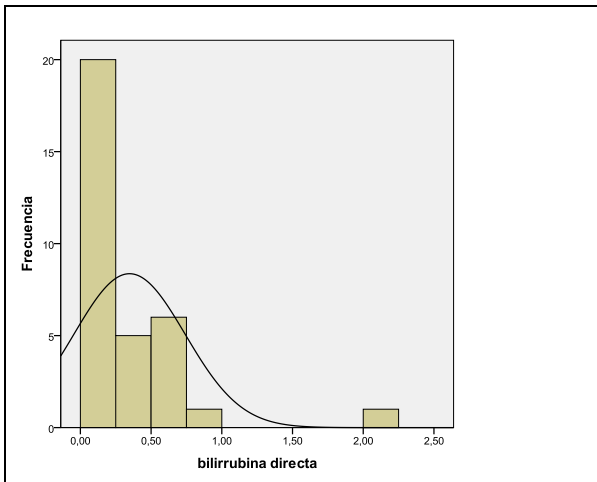


Figura 43. Histograma de GPT ($p = 0.0001$).

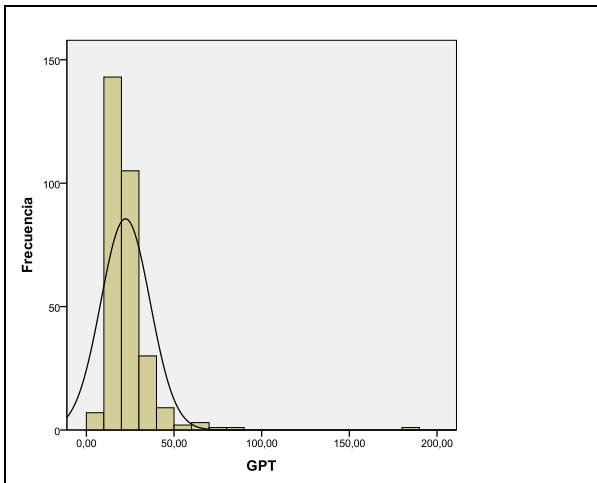


Figura 44. Histograma de LDH ($p = 0.0001$).

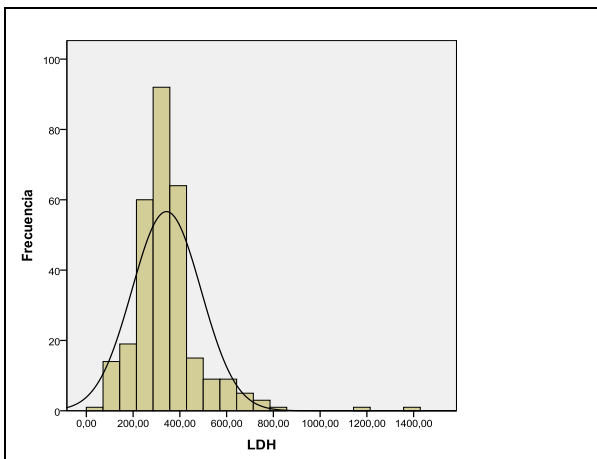


Figura 45. Histograma de FA ($p = 0.001$).

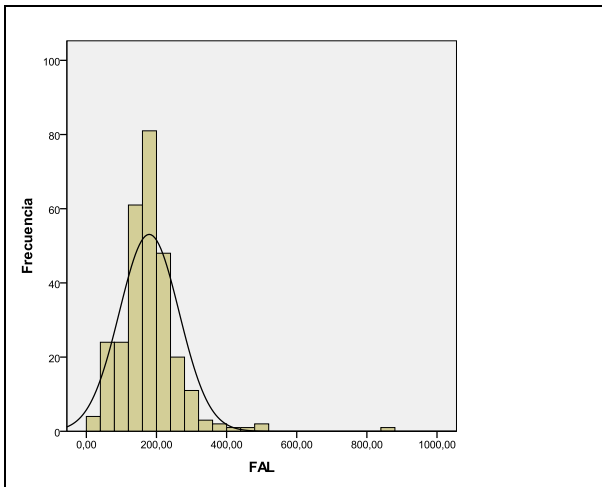


Figura 46. Histograma de proteínas totales ($p = 0.0001$).

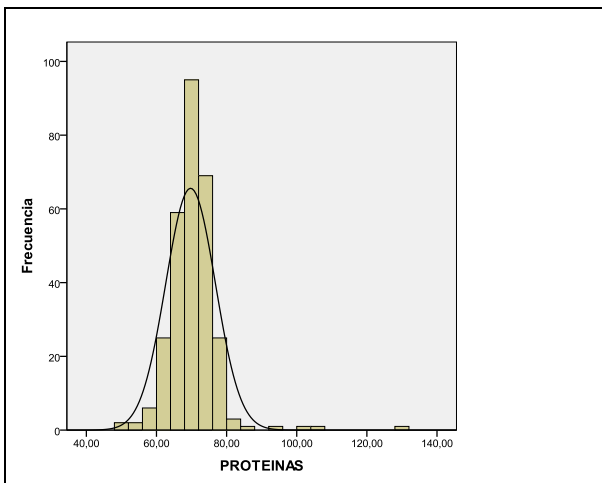


Figura 47. Histograma de albúmina ($p = 0.004$).

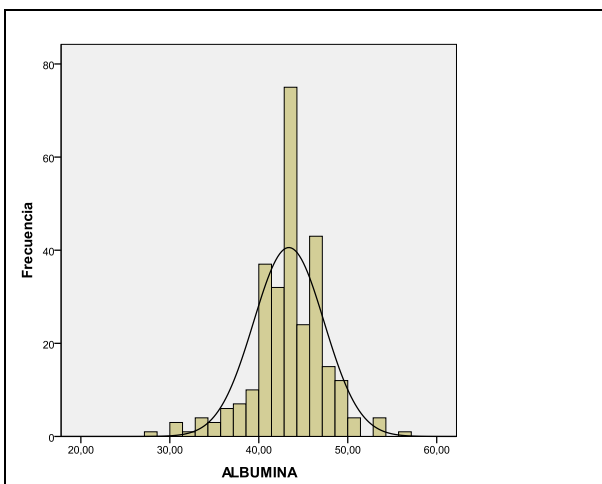


Figura 48. Histograma de IgG ($p = 0.0001$).

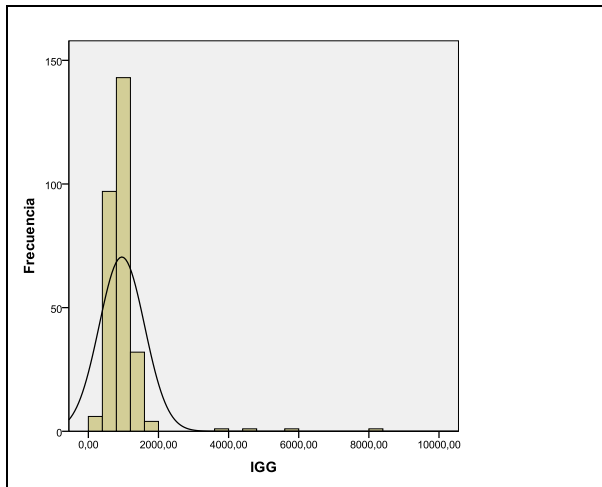


Figura 49. Histograma de IgA ($p = 0.0001$).

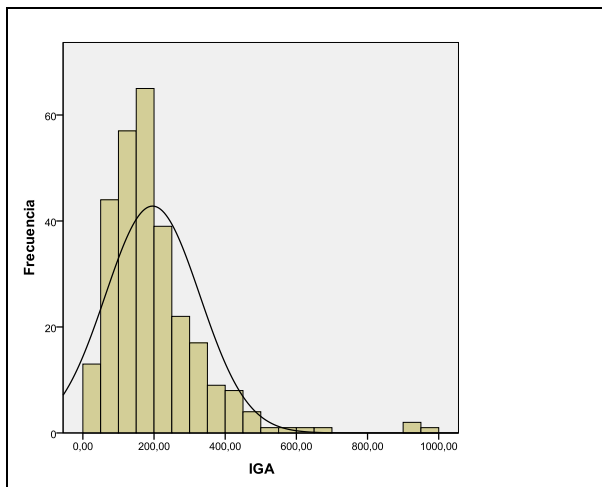


Figura 50. Histograma de IgM ($p = 0.0001$).

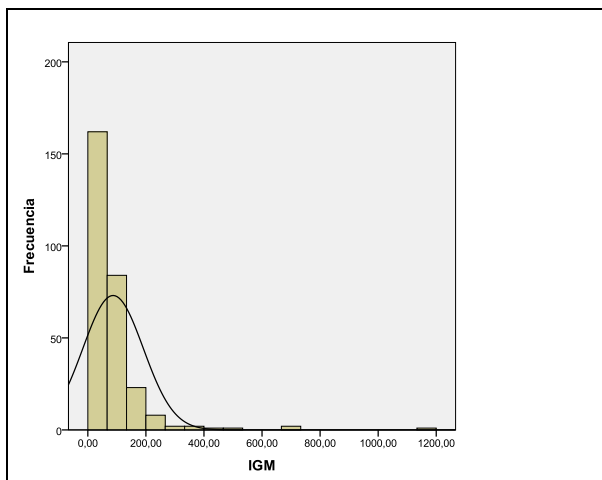


Figura 51. Histograma de $\beta 2$ -microglobulina ($p = 0.0001$).

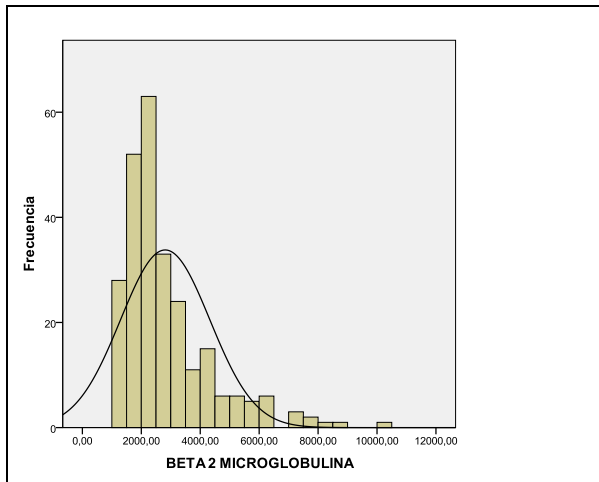


Figura 52. Histograma de VSG ($p = 0.0001$).

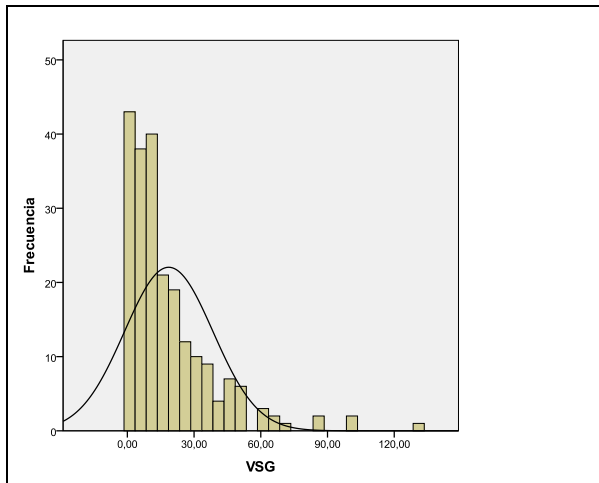


Figura 53. Histograma de PCR ($p = 0.0001$).

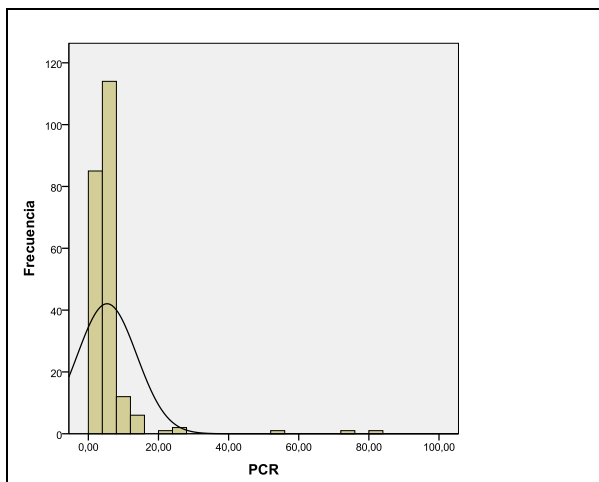


Figura 54. Histograma de TDL ($p = 0.013$).

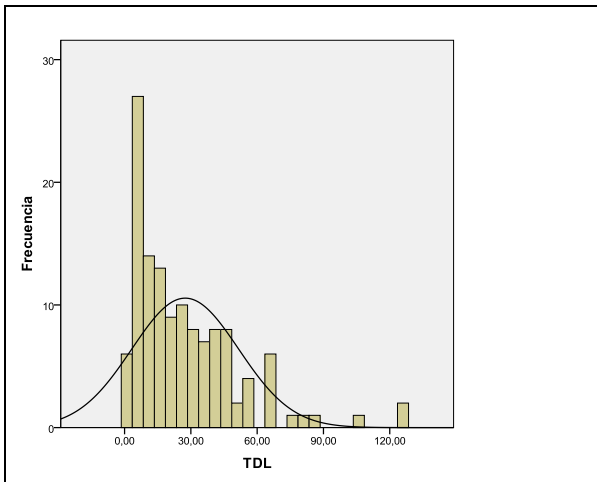


Figura 55. Histograma de linfocitos patológicos ($p = 0.146$).

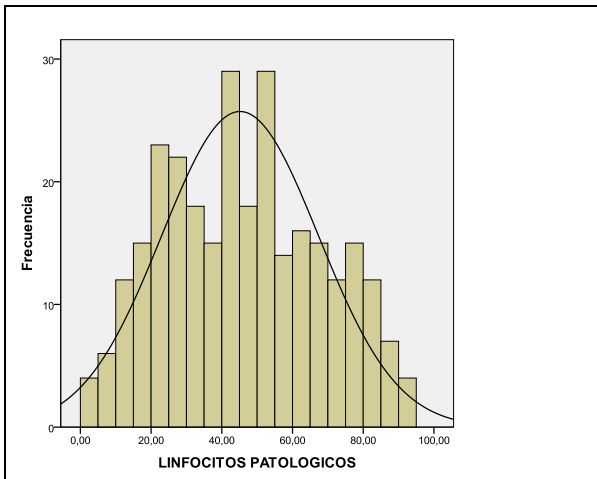


Figura 56. Histograma de nº de meses de seguimiento ($p = 0.014$).

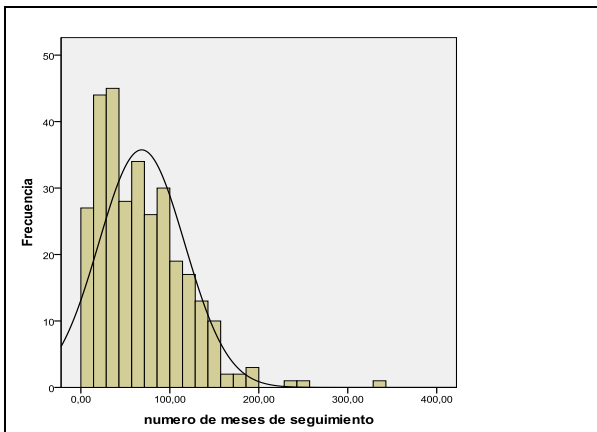


Figura 57. Histograma de número de meses desde el diagnóstico al primer tratamiento (p = 0.0001).

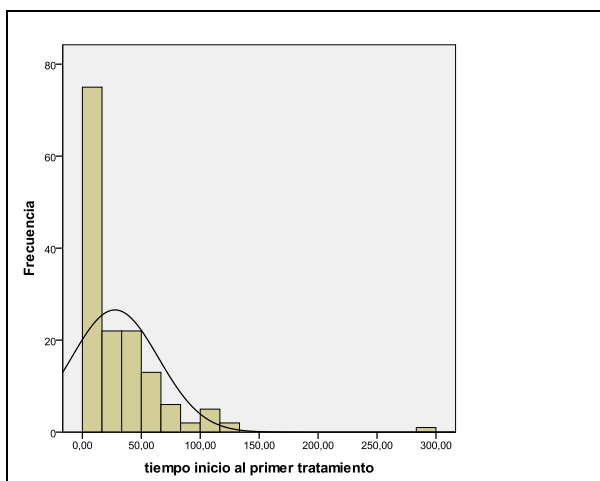
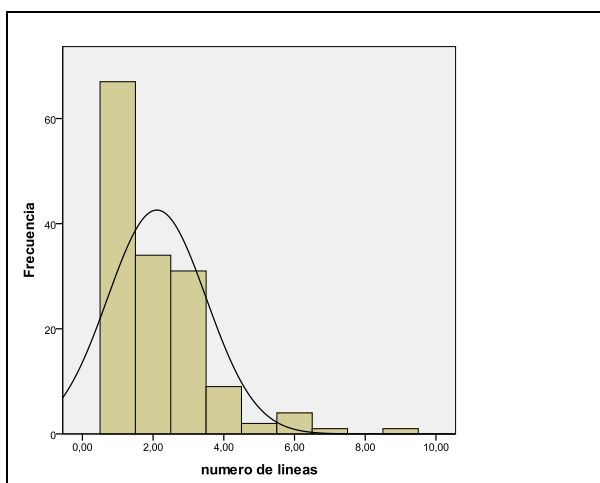


Figura 58. Histograma de número de líneas de tratamiento. (p = 0.0001).



5.2. FACTORES PRONOSTICO DE SUPERVIVENCIA.

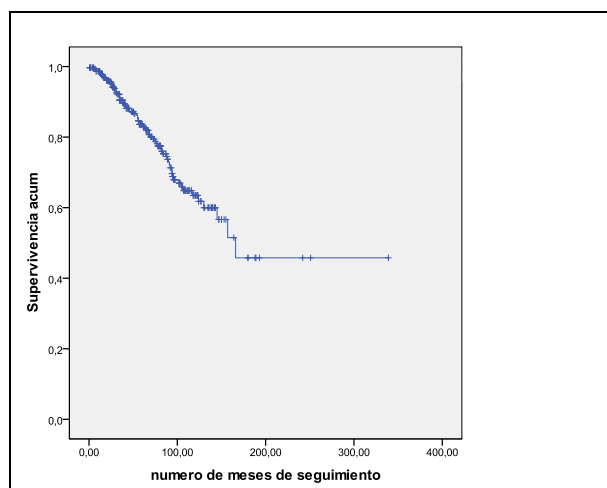
De los 303 pacientes incluidos en el estudio 192 continúan vivos y 76 han fallecido. De los 35 restantes desconocemos la evolución por diversas circunstancias. Como hemos comentado previamente la media de seguimiento fue de 68.37 meses (1-339 meses) y la mediana fue 62 meses. La supervivencia global de nuestra población durante el periodo de tiempo comprendido entre el año 1.991 y Diciembre del año 2.009 (339 meses), fue del 71.64%. La supervivencia acumulada, es decir, la supervivencia obtenida si se realizara un seguimiento de 339 meses a todos los pacientes incluidos en nuestro estudio, sería de un 74.9 % tal y como queda representada en la Figura 59. Por grupos de edad, encontramos diferencias significativas, de manera que la supervivencia en los

pacientes menores de 50 años fue de un 95.8% frente a un 82.1% en el grupo entre 51-64 años y un 69.7% en los mayores de 65 años ($p = 0.0001$) (Figura 60).

Hemos estudiado la supervivencia y el estatus vital en relación con las siguientes variables:

- Variables clínico-biológicas.
- Patrón de infiltración en la biopsia ósea.
- Estudio inmunofenotípico.
- Estudio citogenético.
- Tratamiento.

Figura 59. Supervivencia acumulada en nuestra población.



5.2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO BIOLÓGICAS.

En cuanto al análisis de las variables clínico-biológicas cualitativas y la supervivencia se observó una relación estadísticamente significativa de ésta con la edad (Figura 60), la presencia de adenopatías, hepatoesplenomegalia (Figuras 61, 62 y 63) (Tablas 12, 13 y 14), el estadio clínico según la clasificación de Rai y de Binet (Figuras 64 y 65) (Tablas 15 y 16), la cifra de $\beta 2$ -microglobulina, el TCD y el tiempo de doblaje linfocitario (Figuras 66, 67 y 68) (Tablas 17, 18 y 19). Los pacientes con adenopatías y/o hepatoesplenomegalia presentaron una supervivencia significativamente menor.

En cuanto al estadio clínico, teniendo en cuenta ambos sistemas (Rai y Binet), la supervivencia fue menor a medida que se incrementaba el estadio. Así, la media de supervivencia estimada para los estadios de Rai fue: 234.53 meses para el estadio 0 (95%CI, 188.76-280.29),

129.27 meses para el estadio I (95%CI, 110.055-148.492), 92.11 meses para el estadio II (95%CI, 69.46-114.77), 79.37 meses para el estadio III (95%CI, 49.75-108.99) y 63.18 meses para el estadio IV (95%CI, 39.86-86.50). El sistema de estadiaje de Binet también se correlacionó con la supervivencia siendo la media de supervivencia estimada de 225.62 meses en el estadio A (95%CI, 189.78-261.45), 94,66 meses para el estadio B (95%CI, 75.49-113.84) y 70.14 meses en el estadio C (95%CI, 52.40-87.87).

La supervivencia también se vió influenciada de forma significativa por los niveles de $\beta 2$ -microglobulina, siendo menor en aquellos pacientes con niveles séricos más altos (> 4 mg/L). La presencia de un TCD positivo impactó negativamente con la supervivencia de nuestra serie. Por último, los pacientes que no alcanzaron el tiempo de doblaje linfocitario a lo largo del periodo de seguimiento tuvieron una supervivencia significativamente mayor que aquellos que si lo alcanzaron. En esta serie de pacientes no se han observado diferencias en la supervivencia al analizar el sexo o las alteraciones en el proteinograma.

Figura 60. Supervivencia por grupos de edad ($p = 0.0001$).

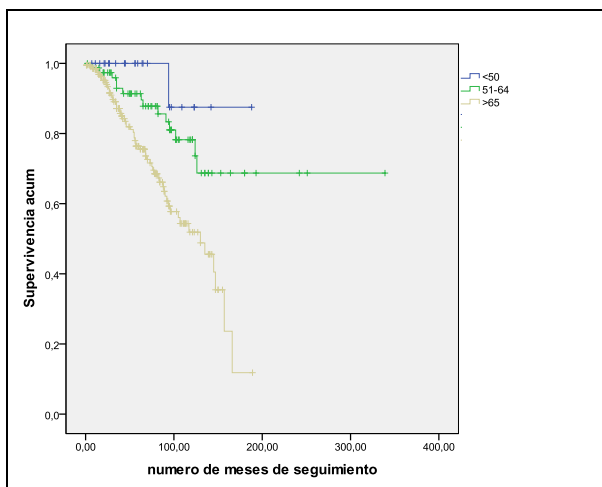
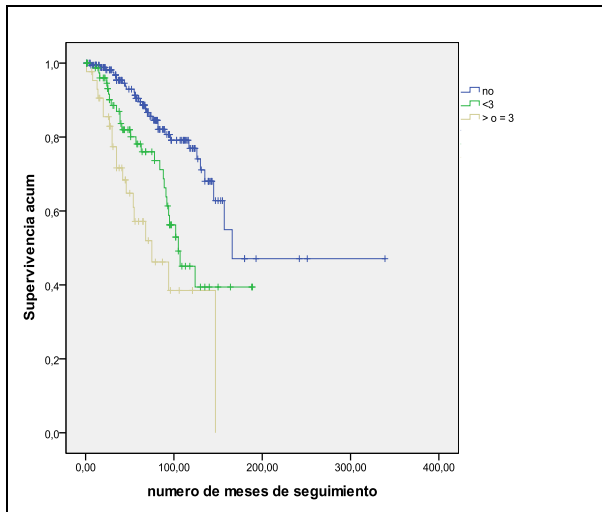


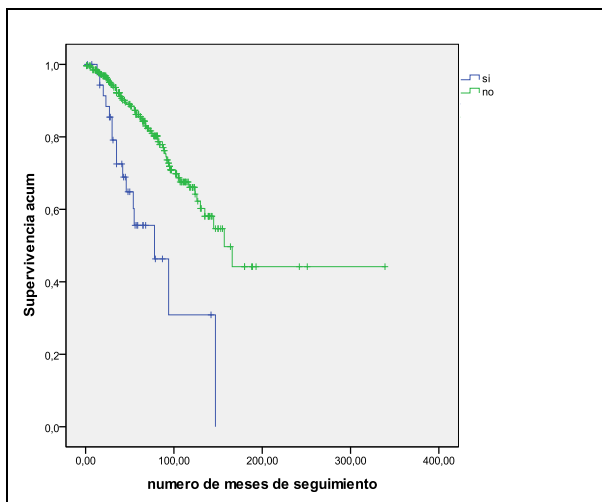
Figura 61 y Tabla 12. Supervivencia en función de la presencia de adenopatías ($p = 0.0001$).



Adenopatías (n = 268)	Vivos	Exitus
No (n = 157)	66.14%	39.47%
< 3 (n = 73)	23.95%	35.52%
≥ 3 (n = 38)	9.91%	25.01%

$p = 0.0001$

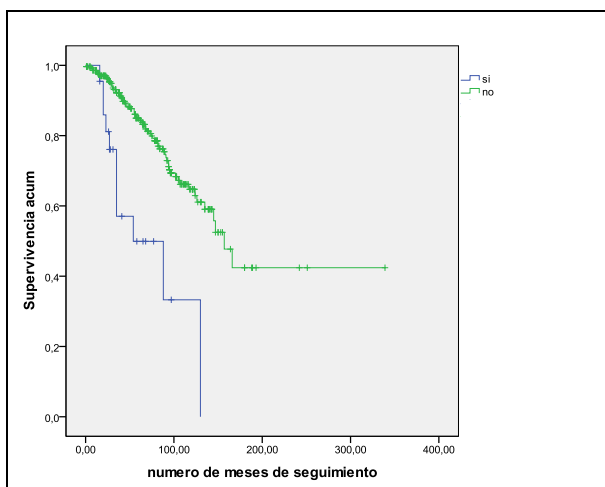
Figura 62 y Tabla 13. Supervivencia en función de la esplenomegalia ($p = 0.0001$).



Esplenomegalia (n = 268)	Vivos	Exitus
No (n = 235)	91.15%	78.95%
Si (n = 33)	8.85%	21.05%

$p = 0.006$

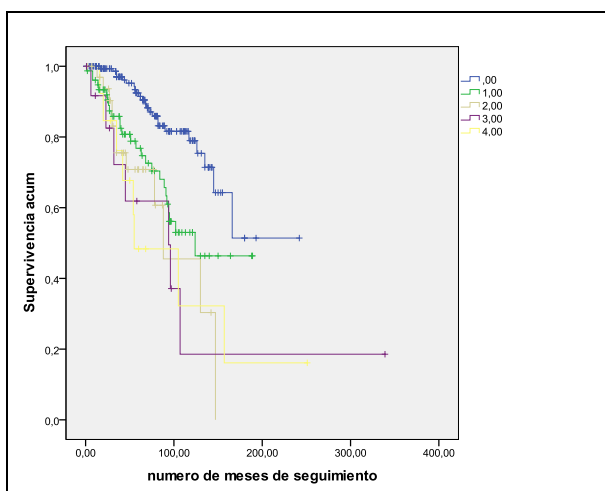
Figura 63 y Tabla 14. Supervivencia en función de la hepatomegalia ($p = 0.0001$).



Hepatomegalia (n = 268)	Vivos	Exitus
No (n = 250)	96.36%	85.53%
Si (n = 18)	3.64%	14.47%

$p = 0.001$

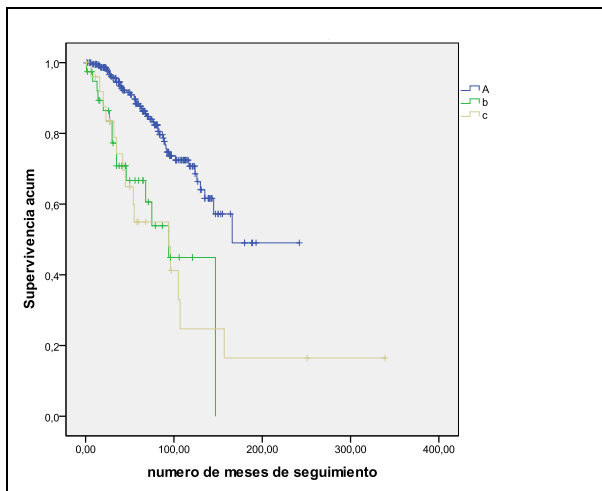
Figura 64 y Tabla 15. Supervivencia en función del estadio clínico Rai ($p = 0.0001$).



Rai (n = 268)	Vivos	Exitus
0 (n = 144)	63.02%	30.26%
I (n = 72)	23.95%	34.21%
II (n = 29)	8.85%	15.78%
III (n = 10)	1.5%	9.2%
IV (n = 13)	2.68%	10.55%

$p = 0.0001$

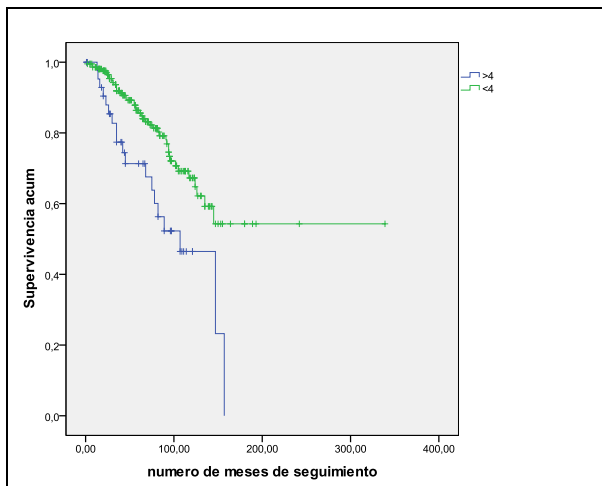
Figura 65 y Tabla 16. Supervivencia en función del estadio clínico Binet ($p = 0.0001$).



Binet	(n = 268)	Vivos	Exitus
A	(n = 212)	86.45%	60.59%
B	(n = 33)	19.56%	19.74%
C	(n = 23)	3.99%	19.74%

$p = 0.0001$

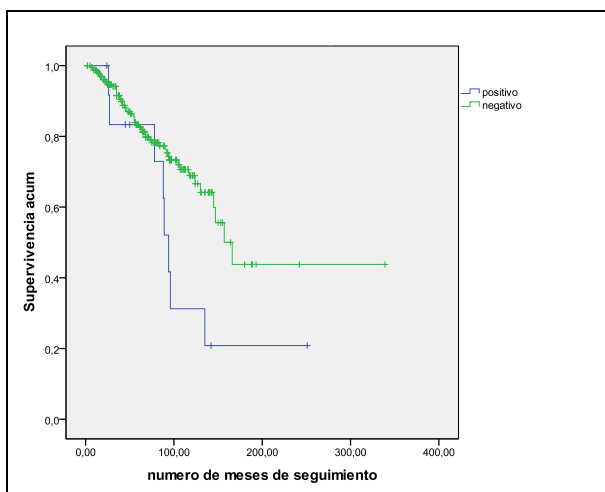
Figura 66 y Tabla 17. Supervivencia en función de la cifra de $\beta 2$ -microglobulina ($p = 0.001$)



$\beta 2M$	(n = 242)	Vivos	Exitus
< 4000 mg/dL	(n= 203)	88.9%	69.9%
> 4000 mg/dL	(n = 39)	11.1%	30.1%

$p = 0.0001$

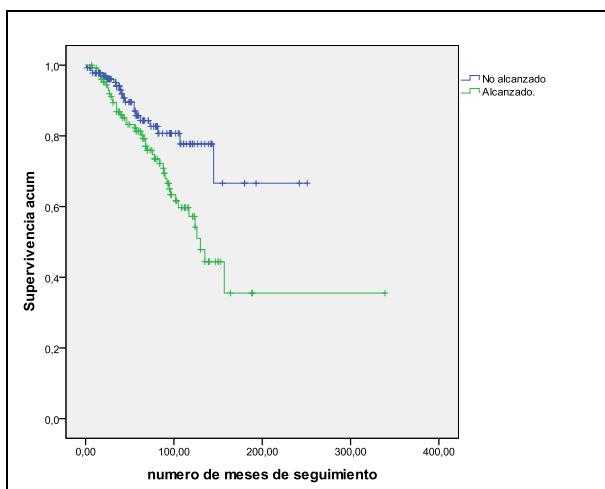
Figura 67 y Tabla 18. Supervivencia en función del TCD ($p = 0.026$).



TCD	(n = 231)	Vivos	Exitus
Negativo	(n = 220)	98.3%	86.9%
Positivo	(n = 11)	1.7%	13.1%

$p = 0.0001$

Figura 68 y Tabla 19. Supervivencia en función del TDL ($p = 0.010$).



TDL	(n = 251)	Vivos	Exitus
No alcanzado	(n = 126)	56.9%	30.1%
Alcanzado	(n = 125)	43.1%	69.9%

$p = 0.0001$

En las variables cuantitativas se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la edad, cifra de hemoglobina, leucocitos, linfocitos, plaquetas, tiempo de doblaje linfocitario,

albúmina, BD, calcio, LDH y β 2-microglobulina (Tabla 20). La edad en el grupo de pacientes fallecidos era significativamente superior a la del grupo de pacientes vivos. La cifra de Hb y plaquetas en los pacientes vivos fue significativamente mayor que en los fallecidos. Por el contrario, la cifra de leucocitos y linfocitos era significativamente menor en los pacientes vivos. Los pacientes vivos tenían una media de valores de LDH y B2-microglobulina significativamente más baja y una media de niveles de BD, calcio y albúmina significativamente más alta al diagnóstico que los pacientes fallecidos. El número de meses de seguimiento desde el diagnóstico de la enfermedad fue significativamente mayor en el conjunto de pacientes vivos y el número de meses transcurridos desde el diagnóstico hasta que se produce la duplicación linfocitaria también lo fue. De igual modo el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el inicio de tratamiento fue significativamente menor en los pacientes fallecidos.

Tabla 20. Comparación variables cuantitativas entre ambos grupos.

Variable	Vivos	Exitus	p
Edad (años)	65.30 \pm 11.24	71.9 \pm 8.12	0.004
Hb (g/ dL)	13.8 \pm 1.71	13.02 \pm 1.88	0.004
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	22932.13 \pm 24346.92	34965.52 \pm 32751.70	0.001
Linfocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	16618.31 \pm 19526.13	26029.77 \pm 25771.30	0.001
Neutrofilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4543.03 \pm 3662.06	4702.45 \pm 3403.59	0.916
Monocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1007.72 \pm 2376.68	1020.31 \pm 1187.76	0.795
Eosinofilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	216.57 \pm 159.06	188.56 \pm 153.65	0.093
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	201.27 \pm 79,37	173.55 \pm 55.67	0.001
Cr (mg/ dL)	1.02 \pm 0.27	1.07 \pm 0.28	0.101
Urato (mg/dL)	5.89 \pm 1.58	6.14 \pm 1.68	0.324
Ca (mg/ dL)	9.32 \pm 0.65	9.08 \pm 0.56	0.037
Bt (mg/ dL)	0.67 \pm 0.32	0.72 \pm 0.31	0.180
Bd (mg/ dL)	0.64 \pm 0.68	0.21 \pm 0.17	0.048
GPT (u.int/ L)	22.31 \pm 9.6	21.25 \pm 11.76	0.147
LDH (u.int/ L)	324.31 \pm 114.8	400.15 \pm 205.67	0.001
FAL (u.int/ L)	172.23 \pm 70.49	193.74 \pm 112.11	0.105
PT (g/ L)	70.38 \pm 7.13	68.83 \pm 7.05	0.079
Alb (g/ L)	43.82 \pm 3.79	42.90 \pm 3.76	0.020
IgG (mg/ dL)	970.43 \pm 688.66	950.57 \pm 647	0.245

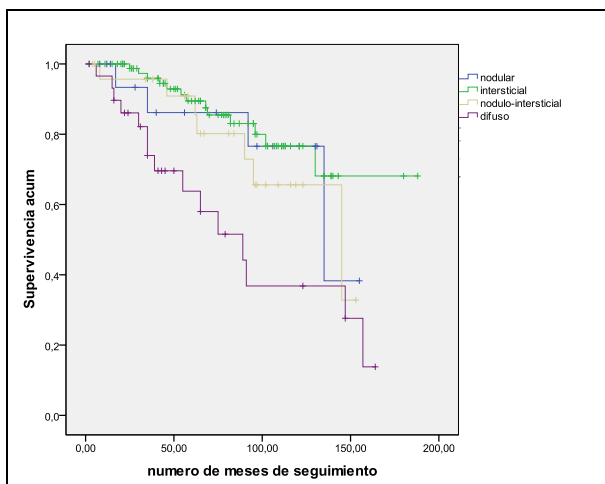
Tabla 20. Comparación variables cuantitativas entre ambos grupos.

IgA (mg/ dL)	190.23 ± 102.12	205.65 ± 180.11	0.373
IgM (mg/ dL)	84.84 ± 107.66	90.41 ± 84.42	0.702
β2M (mg/ dL)	2412.31 ± 1067.78	3626.07 ± 1917.69	0.0001
VSG (mm/ h)	16.67 ± 17.22	19.96 ± 20.79	0.226
PCR (mg/ L)	5.45 ± 8.31	5.62 ± 9.48	0.647
TDL (meses)	31.24 ± 24.97	20.36 ± 20.88	0.002
% linfocitos patológicos	40.23 ± 21.38	54.34 ± 20.48	0.668

5.2.2. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS.

La biopsia ósea se realizó en 178 pacientes, de las cuales 18 fueron informadas como “normales”, sin evidencia de infiltración por síndrome linfoproliferativo. Al realizar el análisis teniendo en cuenta los cuatro patrones infiltrativos se observaron diferencias estadísticamente significativas en las curvas de supervivencia, de manera que en los pacientes con un patrón difuso la supervivencia fue menor (50%), seguido del patrón nódulo-intersticial (72%), el nodular (77.8%) y por último, el intersticial con mayor supervivencia (85.1%) (Figura 69) (Tablas 21 y 22).

Figura 69 y Tablas 21 y 22. Supervivencia en función del patrón de infiltración en la biopsia ósea (p = 0.002).



B.O. (n = 165)	Vivos	Exitus
Patrón no difuso (n = 139)	91.8%	62.7%
Patrón difuso (n = 26)	8.2%	37.3%

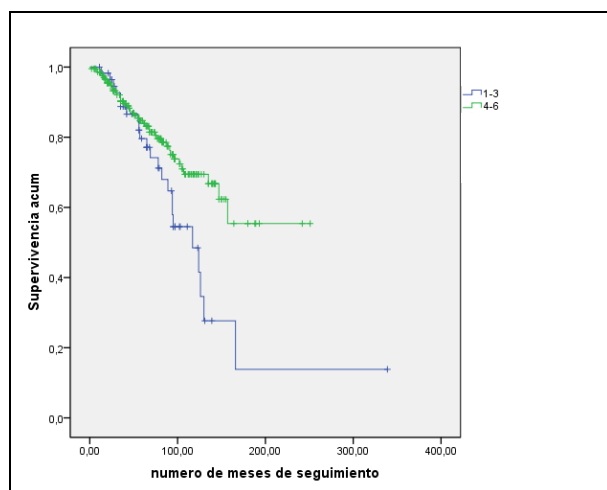
B.O. (n = 147)	Vivos	Exitus
Nodular (n = 17)	11.1%	10.2%
Intersticial (n = 84)	64.8%	33.3%
Nódulo-intersticial (n = 22)	15.7%	17.9%
Difuso (n = 24)	8.4%	38.6%

p = 0.0001

5.2.3. CARACTERÍSTICAS INMUNOFENOTÍPICAS.

Al comparar ambos grupos de pacientes se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el estatus vital y el *score* inmunofenotípico propuesto por el grupo Matutes (p = 0.021). Las curvas de supervivencia al dividir a los pacientes en 2 grupos (score 1-3 versus score 4-6) fueron diferentes, y esta diferencia alcanzó significación estadística (Figura 70).

Fig 70. Supervivencia en función del score inmunofenotípico (p = 0.011).



5.2.4. CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS.

Las alteraciones citogenéticas fueron agrupadas en 3 grupos de riesgo: favorable (delección 13q, FISH y/o citogenética convencional normal), intermedio (trisomía 12, delección 6q y/o 1 ó 2 alteraciones en el cariotipo) y desfavorable (delección 11q, delección 17p y/o cariotipo complejo). (Tabla 23).

Hallamos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en relación con la presencia o no de alteraciones cromosómicas por citogenética convencional, de manera que en el

grupo de pacientes fallecidos el cariotipo anómalo era significativamente más frecuente que en el grupo de los vivos (Tabla 24). La supervivencia fue significativamente mayor en los pacientes que no presentaban anomalías cromosómicas por FISH (Figura 71). Por citogenética convencional no encontramos diferencias en las curvas de supervivencia entre ambos grupos, pero sí es de destacar la tendencia de los pacientes sin anomalías cariotípicas a tener una mayor supervivencia ($p = 0.073$). En cuanto al tipo de aberración, no encontramos diferencias en la curva de supervivencia ni por citogenética convencional ni por FISH. Al considerar a los pacientes en los tres grupos citogenéticos pronóstico (favorable, intermedio y desfavorable) también encontramos diferencias estadísticamente significativas, de manera que la supervivencia fue menor en los pacientes del grupo desfavorable (59,1%), seguido del intermedio (67,7%) y del favorable (81,7%) (Figura 72) (Tabla 25). Igualmente, la necesidad de tratamiento fue mayor en los pacientes del grupo desfavorable seguido del intermedio y del favorable.

En el análisis de la evolución clonal se incluyeron 88 pacientes diagnosticados de LLC, estudiados por FISH, al diagnóstico y durante su evolución, salvo un paciente en el que el estudio se realizó por citogenética convencional. Investigamos diversos factores clínicos y biológicos (edad, B2M, ZAP70, CD38, del13q, +12, del11q, del17p, estadio, líneas de tratamiento, meses hasta el inicio del primer tratamiento, meses de seguimiento, estatus vital y segundas neoplasias).

En el grupo sin evolución clonal (46/88), la mayoría (34/46) no mostraba alteraciones al diagnóstico ni en el seguimiento. Los 12 restantes mantuvieron las mismas anomalías que en el estudio basal: del13q ($n = 6$, dos de ellas asociadas a otra anomalía, una a la del11q y otra a la del17p), del11q ($n = 2$, una de ellas asociada a la del13q), y +12 ($n = 4$). En el grupo que sí sufrió evolución clonal (42/88), 29 tenían FISH normal al diagnóstico. La alteración única más observada fue la del13q ($n = 17$); seguida de la del17p ($n = 2$), y la +12 ($n = 1$).

En el estudio univariante, la única variable del diagnóstico relacionada con evolución clonal fue el número de líneas de quimioterapia recibidas ($p = 0,011$). Se apreció una mayor tendencia en los pacientes con evolución clonal a cifras de $\beta 2M$ más elevadas ($p = 0,068$). La supervivencia en los pacientes que presentaron evolución clonal a lo largo del periodo de seguimiento fue significativamente menor que la de los pacientes que no la presentaron ($p = 0.012$) (Figura 73). Los resultados obtenidos para CD38 y ZAP70 serán comentados más adelante.

Tabla 23. Alteraciones cromosómicas por grupos de riesgo citogenético en nuestra serie.

Grupo pronóstico	N= 206	%
Favorable (del 13q, FISH y/o citogenética convencional normal)	153	74.3
Intermedio (+12, del 6q y/o 1 ó 2 alteraciones en el cariotipo)	31	15
Desfavorable (delección 11q, delección 17p y/o cariotipo complejo)	22	10.7

Tabla 24. Comparación de la citogenética convencional entre ambos grupos.

Citogenética convencional (n = 151)	Vivos	Exitus
Normal (n = 107)	76.1%	55.26%
Anormal (n = 44)	23.9%	44.74%

p = 0.014

Figura 71. Supervivencia en función de los hallazgos del estudio FISH (p = 0.001).

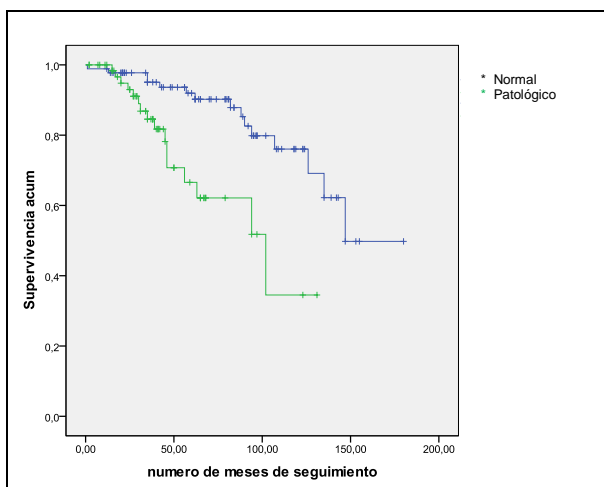
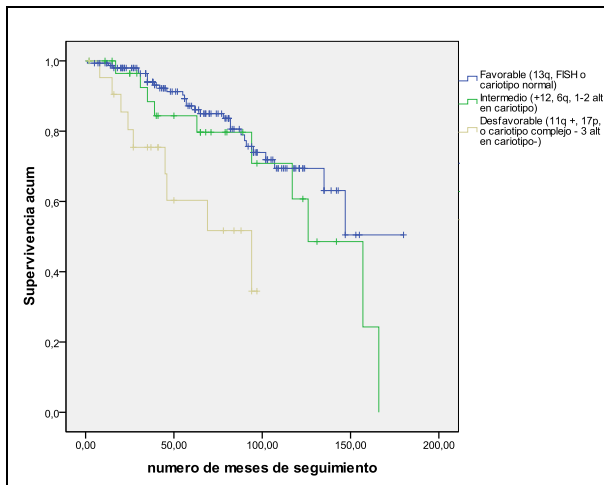


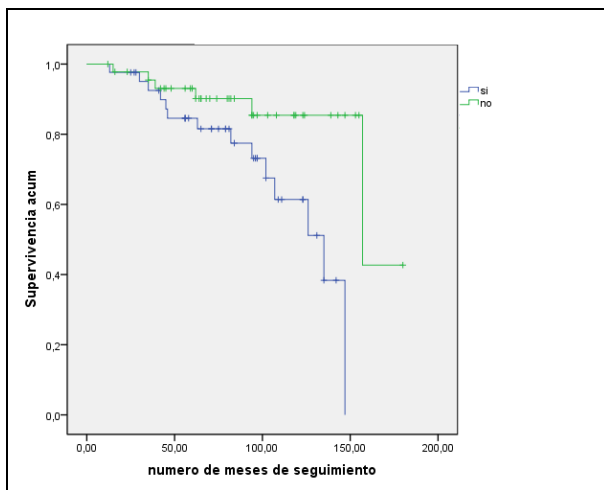
Figura 72 y Tabla 25. Supervivencia en función de las alteraciones cromosómicas por grupos de riesgo ($p = 0.001$).



Grupos pronostico (n = 199)	Vivos	Exitus
Favorable (n = 148)	78.9%	59.5%
Intermedio (n = 29)	12.5%	21.2%
Desfavorable (n = 22)	8.6%	19.3%

$p = 0.025$

Figura 73. Supervivencia en función de la evolución clonal ($p = 0.012$).



5.2.5. TRATAMIENTO.

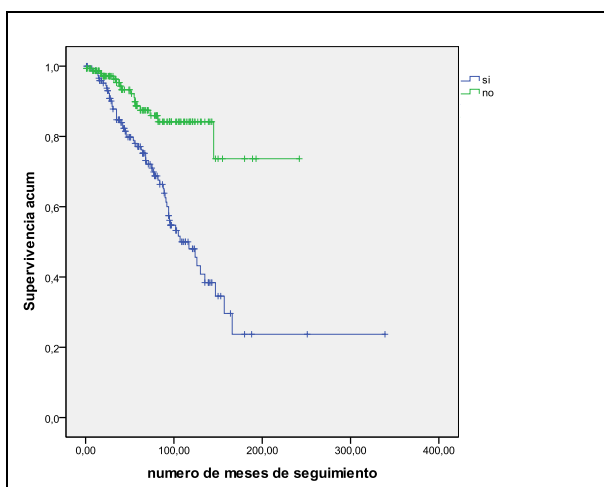
Durante el periodo de seguimiento, el 50.8% de los pacientes de nuestra serie no han precisado tratamiento a lo largo de la evolución de la enfermedad frente a un 49.2% que sí. La

mayoría de pacientes que recibieron tratamiento no necesitaron más de tres líneas (67.1%), frente a un porcentaje más pequeño (32.9%) que sí.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las curvas de supervivencia, de manera que en aquellos pacientes que recibieron tratamiento la supervivencia fue significativamente inferior a la de los pacientes que no lo recibieron (Figura 74) (Tabla 26). El número de líneas de quimioterapia fue significativamente menor en los pacientes vivos (Tabla 27), sin embargo no encontramos otras diferencias en las curvas de supervivencia, ni siquiera al separar a los pacientes por el número de líneas recibidas en 2 grupos (menos de 3 líneas de tratamiento versus más de 3).

También se determinó, en los pacientes que necesitaron tratamiento, el número de meses transcurridos desde el diagnóstico de la enfermedad hasta el inicio de éste. La media de meses transcurridos desde el diagnóstico de la enfermedad hasta el inicio del primer tratamiento fue de 27.63 meses (1–289 meses). Al comparar ambos grupos hallamos una diferencia estadísticamente significativa, de manera que la media de meses pasados desde el diagnóstico hasta el inicio del primer tratamiento en los pacientes vivos fue mayor que en los fallecidos (Tabla 27).

Figura 74 y Tabla 26. Supervivencia en función del tratamiento ($p = 0.0001$).



Tratamiento (n = 268)	Vivos	Exitus
Sí (n = 192)	40.6%	78.9%
No (n = 76)	59.4%	21.1%

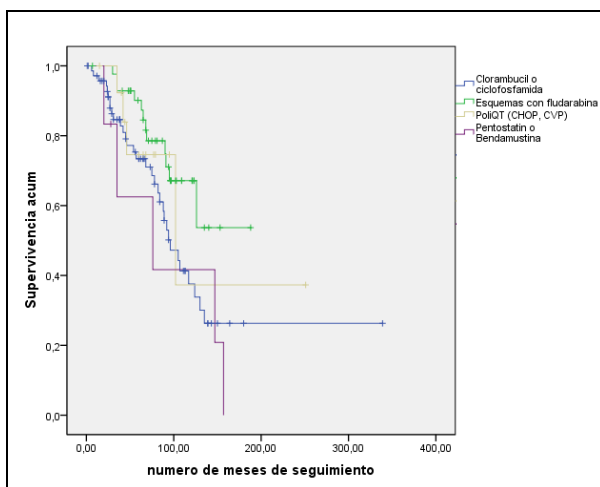
$p = 0.0001$

Tabla 27. Comparación del nº de líneas y tiempo transcurrido hasta el inicio del primer tratamiento entre el grupo de pacientes vivos y el de fallecidos.

Variable	Vivos	Exitus	p
Nº líneas	1.76 ± 1.13	2.7 ± 1.58	0.0001
Seguimiento (meses)	77.15 ± 50.42	61 ± 53.95	0.023
Tpo inicio al 1º tto	32.93 ± 42.91	21.2 ± 25.48	0.038

En cuanto a los distintos esquemas de tratamiento recibidos, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos, de forma que en los pacientes que fueron tratados con esquemas con fludarabina y poliquimioterapia tipo CHOP y/o COP, el porcentaje de pacientes vivos fue superior al de aquellos que habían recibido alquilantes, pentostatina y/o bendamustina (Tabla 28). Al analizar las curvas de supervivencia entre los 4 grupos de tratamiento observamos una tendencia a la significación estadística ($p = 0.082$) (Figura 75), a pesar de lo cual no encontramos diferencias al comparar el grupo de pacientes que habían recibido esquemas con fludarabina frente a los que no.

Figura 75 y Tabla 28. Supervivencia en función de los 4 grupos de tratamiento ($p = 0.082$).



Tratamiento (n = 124)	Vivos	Exitus
Esquemas con leukeran	40.8%	60.3%
Esquemas con fludarabina	43.6%	22.6%
Poliquimioterapia	14%	7.5%
Pentostatina vs Bendamustina	1.6%	9.6%

$p = 0.010$

5.3. ANTIGENO DE SUPERFICIE CD38.

La determinación de la expresión del antígeno de superficie CD38 se ha realizado en 264 pacientes del estudio y se han identificado dos grupos de pacientes en función de la expresión de este antígeno: CD38+ y CD38-, habiéndose establecido el punto de corte en el 20%. El porcentaje de pacientes CD38+ fue de un 37.9% frente a un 62.1% de pacientes CD38- (Tabla 7) (Fig. 24). En este apartado hemos comparado ambos grupos con las diferentes variables clínicas, biológicas y de seguimiento, obteniendo los resultados que se muestran a continuación:

5.3.1. EXPRESION DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE CD38 Y VARIABLES CLINICO-BIOLÓGICAS.

En cuanto al análisis de las variables clínico-biológicas cualitativas no se han observado diferencias estadísticamente significativas en cuanto al sexo, alteración en el proteinograma o en el test de Coombs directo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia o no de adenopatías y hepatoesplenomegalia, de manera que los pacientes CD38+ presentaban significativamente más adenopatías y hepatoesplenomegalia que aquellos CD38- (Tablas 29, 30 y 31); y en el estadio clínico (Rai y Binet) de manera que en el momento del diagnóstico, en los pacientes CD38-, los estadios 0 de Rai y A de Binet, fueron significativamente más frecuentes que en los pacientes CD38+ (Tabla 32 y 33). En relación con la β 2-microglobulina (Tabla 34), el porcentaje de pacientes con una cifra de β 2-microglobulina menor de 4000 mg/ dL fue mayor cuando el antígeno CD38 resultaba negativo.

Tabla 29. Comparación de la presencia de adenopatías en función de la expresión del Ag CD38.

Adenopatías	CD38 (n = 264)	
	Pos.	Neg.
No	38%	71.95%
< 3	35%	21.34%
> 3	27%	6.7%

p = 0.0001

Tabla 30. Comparación de la presencia de esplenomegalia en función de la expresión del Ag CD38.

Esplenomegalia	CD38 (n = 264)	
	Pos.	Neg.
Si	23%	6.09%
No	77%	93.91%

p = 0.0001

Tabla 31. Comparación de la presencia de hepatomegalia en función de la expresión del Ag CD38.

Hepatomegalia	CD38 (n = 264)	
	Pos.	Neg.
Si	12%	4.87%
No	88%	95.13%

p = 0.034

Tabla 32. Comparación del estadio clínico (Rai) en función de la expresión del Ag CD38.

Estadio Rai	CD38 (n = 264)	
	Pos.	Neg.
0	33%	67.7%
I	35%	19.6%
II	21%	6.7%
III	4%	3%
IV	7%	3%

p = 0.0001

Tabla 33. Comparación del estadio clínico (Binet) en función de la expresión del Ag CD38.

Estadio Binet	CD38 (n = 259)	
	Pos.	Neg.
A	65%	87.8%
B	24%	6.1%
C	11%	6.1%

p = 0.0001

Tabla 34. Comparación del nivel de β 2-microglobulina en función de la expresión del Ag CD38.

B2M	CD38 (n = 234)	
	Pos.	Neg.
< 4000 mg/dL	76.2%	89%
> 4000 mg/dL	23.8%	11%

p = 0.009

De entre las variables cuantitativas evaluadas se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la cifra de BD, FA, LDH y β 2-microglobulina (Tabla 35). Los pacientes CD38+ tenían una cifra de BD y FA significativamente más baja y un valor de β 2-microglobulina y LDH significativamente más elevado que los CD38-. El tiempo de doblaje linfocitario también resultó significativamente más corto en los pacientes CD38+, al igual que el número de meses de seguimiento y el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el inicio del primer tratamiento.

Tabla 35. Comparación entre variables cuantitativas en función de la expresión del Ag CD38.

Variable	CD38-	CD38+	p
Edad (años)	66.75 \pm 11.15	67.31 \pm 10.13	0.278
Hb (g/ dL)	13.80 \pm 1.63	13.39 \pm 1.99	0.262
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	23432.56 \pm 22696.53	32554.90 \pm 34609.24	0.078
Linfocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	17227.07 \pm 18684.46	23923.75 \pm 27262.89	0.096
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4479.17 \pm 2573.18	4984.87 \pm 4854.67	0.409
Monocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1006.33 \pm 2452.04	1104.44 \pm 1488.84	0.049
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	205.03 \pm 153.4	213.96 \pm 157.93	0.959
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	194060 \pm 55128	185470 \pm 60800	0.355
Cr (mg/ dL)	1.03 \pm 0.27	1.03 \pm 0.26	0.976
Urato (mg/ dl)	5.86 \pm 1.63	6.07 \pm 1.56	0.965
Ca (mg/ dL)	9.27 \pm 0.61	9.24 \pm 0.59	0.523
Bt (mg/ dL)	0.67 \pm 0.34	0.70 \pm 0.31	0.558
Bd (mg/ dL)	0.49 \pm 0.50	0.18 \pm 0.12	0.036
GPT (u.int/ L)	22.97 \pm 16.78	22.32 \pm 10.51	0.729
LDH (u.int/ L)	309.66 \pm 105.47	388.96 \pm 191.43	0.0001
FAL (u.int/ L)	169.60 \pm 85.76	191.15 \pm 88	0.033
PT (g/ L)	70.3 \pm 7.47	68.9 \pm 5.36	0.107

Tabla 35. Comparación entre variables cuantitativas en función de la expresión del Ag CD38.

Alb (g/ L)	43.4 ± 4.01	43.57 ± 3.69	0.989
IgG (mg/ dL)	1016.25 ± 772.62	840.54 ± 289.71	0.008
IgA (mg/ dL)	203.56 ± 129.94	189.90 ± 151.44	0.054
IgM (mg/ dL)	85.37 ± 102.02	78.57 ± 90.84	0.025
β2M (mg/ dL)	2556.41 ± 1391.16	3075.64 ± 1600.5	0.004
VSG (mm/ h)	16.7 ± 16.18	18.43 ± 20.97	0.618
PCR (mg/ L)	5.59 ± 9.09	5.61 ± 8.27	0.231
TDL (meses)	29.58 ± 22.42	24.33 ± 26.49	0.035
Linfocitos patológicos (%)	41.66 ± 21.08	50.2 ± 22.43	0.475
Nº meses de seguimiento	77.95 ± 51.68	53.47 ± 38.28	0.0001
Nº meses al primer tto	37.47 ± 46.29	17.48 ± 21.54	0.003

5.3.2. EXPRESION DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE CD38 Y PATRON DE INFILTRACION EN LA BIOPSIA OSEA.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos patrones de infiltración de manera que, el patrón difuso fue más frecuente en los pacientes CD38+ y el patrón intersticial en los CD38- (Tabla 36). Al separarlos en dos grupos: difuso y no difuso, dicha diferencia se incrementó. Así los pacientes CD38+ presentaron un patrón difuso en un porcentaje significativamente mayor que los CD38- (Tabla 37).

Tabla 36. Comparación del patrón de infiltración en la B.O. en función de la expresión del Ag CD38.

Biopsia medular	CD38 (n = 142)	
	Pos.	Neg.
Nodular	9.6%	13.75%
Intersticial	45.16%	66.25%
Nódulo-intersticial	11.29%	12.5%
Difuso	33.95%	7.5%

p = 0.001

Tabla 37. Comparación del patrón de infiltración en la B.O. en función de la expresión del Ag CD38.

Biopsia medular	CD38 (n = 159)	
	Pos.	Neg.
Patrón no difuso	66.6%	92.4%
Patrón difuso	33.4%	7.6%

p = 0.0001

5.3.3. EXPRESION DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE CD38 Y ESTUDIO INMUNOFENOTIPICO.

Al comparar ambos grupos de pacientes se observó una relación estadísticamente significativa entre la expresión de CD38 y el *score* inmunofenotípico propuesto por el grupo de Matutes (p = 0.0001). Así, pudimos comprobar que los pacientes CD38+ tenían un *score* significativamente más bajo que los CD38- (Tabla 38). Esta diferencia también resultó patente al separar en función del *score* en 2 grupos (1-3 vs 4-6) (Tabla 39).

Al determinar la proteína tirosin-kinasa ZAP70 mediante citometría de flujo y compararla entre ambos grupos, CD38+ y CD38-, no hemos observado diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 38. Comparación del *score* inmunofenotípico en función de la expresión del Ag CD38.

Score inmunofenotípico	CD38 (n = 257)	
	Pos.	Neg.
1	0%	0.61%
2	8.5%	3.06%
3	30.85%	6.74%
4	28.72%	22.08%
5	24.46%	50.3%
6	7.47%	17.48%

p = 0.0001

Tabla 39. Comparación del *score* inmunofenotípico en función de la expresión del Ag CD38.

Score inmunofenotípico	CD38 (n = 257)	
	Pos.	Neg.
1-3	38.29%	13.49%
4-6	61.71%	86,51%

p = 0.0001

5.3.4. EXPRESION DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE CD38 Y ESTUDIO CITOGENETICO.

Hallamos una relación significativa al comparar la expresión de CD38 y la presencia o no de alteraciones cromosómicas determinadas por citogenética convencional y por FISH. Así, en los pacientes CD38+ el porcentaje de alteraciones cromosómicas fue mayor que en los CD38- (Tablas 40 y 41). Al analizar a los pacientes que presentaban un estudio de FISH patológico también encontramos diferencias entre ambos grupos (CD38- vs CD38+) (p = 0.022), de modo que la deleción 13q aislada fue significativamente más frecuente en los pacientes CD38-, mientras que la trisomía 12 y las deleciones 11q y 6q fueron más habituales en los pacientes CD38+ (Tabla 42). Como dato incongruente destacar que la deleción 17p se detectó en 4 pacientes CD38- y en ningún paciente CD38+. Al analizar las distintas alteraciones citogenéticas por separado, solo la +12 y la del11q fueron significativas, siendo ambas más frecuentes en los pacientes CD38+.

Tabla 40. Comparación de anomalías cromosómicas por CC en función de la expresión del Ag CD38.

Citogenética	CD38 (n = 150)	
	Neg	Pos
CC normal (n = 105)	78.16%	58.73%
CC anormal (n = 45)	21.84%	41.27%

p = 0.010

Al agrupar las alteraciones citogenéticas en 3 grupos de riesgo (favorable, intermedio y desfavorable) encontramos diferencias significativas (p = 0.0001), siendo las alteraciones del grupo favorable más frecuentes en los pacientes CD38-, y las del grupo intermedio y desfavorable más frecuentes en los CD38+ (Tabla 43).

Tabla 41. Comparación de anomalías cromosómicas por FISH en función de la expresión del Ag CD38.

FISH	CD38 (n = 150)	
	Neg	Pos
FISH normal (n = 86)	70.65%	36.2%
FISH anormal (n = 64)	29.35%	63.8%

p = 0.0001

No encontramos relación entre la expresión de CD38 y la aparición de nuevas alteraciones cromosómicas a lo largo de la evolución de la enfermedad, sí al agrupar dichas alteraciones en 2 grupos: los que no presentaron evolución clonal o presentaron la delección 13q de forma aislada y los que presentaron anomalías distintas a la delección 13q (p = 0.001) (Tabla 44), de manera que los pacientes CD38+ presentaron a lo largo de la evolución de la enfermedad alteraciones cromosómicas diferentes a la del13q con más frecuencia que los CD38-.

Tabla 42. Comparación de las distintas alteraciones cromosómicas (FISH) en función de la expresión del Ag CD38.

Alteraciones por FISH	CD38 (n = 64)		p
	Neg	Pos	
Del 13q (n = 29)	62.96%	32.43%	0.295
+12 (n = 18)	11.14%	40.54%	0.0001
Del 11q (n = 3)	0%	8.1%	0.007
Del 6q (n = 1)	0%	2.71%	0.386
Del 17p (n = 1)	3.7%	0%	0.107
Del 13q, del 11q (n = 6)	3.7%	13.51%	
Del 11q, +12 (n = 2)	3.7%	2.71%	
Del 13q, del 6q (n = 1)	3.7%	0%	
Del 13q, del 17p (n = 2)	7.4%	0%	
Del 11q, del 17p (n = 1)	3.7%	0%	

*p = 0.022 (comparación de las distintas alteraciones en conjunto).

Tabla 43. Comparación de los grupos de riesgo CC y/o FISH en función de la expresión del Ag CD38.

Grupos citogenéticos	CD38 (n = 199)	
	Neg	Pos
Favorable	83.19%	60%
Intermedio	7.56%	26.25%
Desfavorable	9.25%	13.75%

p = 0.0001

Tabla 44. Comparación de los grupos de evolución clonal en función de la expresión del Ag CD38.

Evolución clonal	CD38 (n = 85)	
	Neg	Pos
No evolución clonal o del 13q aislada	87.75%	12.25%
Evolución clonal no del 13q aislada	55.5%	44.5%

p = 0.001

5.3.5. EXPRESION DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE CD38 Y TRATAMIENTO.

Se compararon ambos grupos, CD38+ y CD38-, observando una relación estadísticamente significativa ($p = 0.0001$) entre la expresión del Ag CD38 y la necesidad de requerir algún tipo de tratamiento a lo largo del periodo de seguimiento. El porcentaje de pacientes CD38+ que precisó tratamiento fue mayor (68%) que el objetivado en el grupo CD38- (37.8%) (Tabla 45). En cuanto a las líneas de tratamiento no apreciamos diferencias entre ambos grupos. Tampoco encontramos diferencias entre ambos grupos en cuanto a haber recibido o no tratamiento con fludarabina. Por contra, cuando reunimos a los pacientes en 4 grupos de tratamiento (alquilantes, esquemas con fludarabina, poliquimioterapia tipo CHOP o COP y bendamustina/pentostatina), encontramos que los pacientes CD38- recibieron alquilantes en un porcentaje significativamente mayor que los CD38+, y éstos a su vez fueron sometidos a esquemas más agresivos con fludarabina y poliquimioterapia (Tabla 46). Todas estas comparaciones también se realizaron por grupos de edades. En el grupo de pacientes mayores de 65 años y entre 50 a 65 años solo se observaron diferencias en cuanto a la necesidad de recibir tratamiento.

También se determinó, en los pacientes que necesitaron tratamiento, el número de meses transcurridos desde el diagnóstico de la enfermedad hasta el inicio de éste, siendo la media de 27.63 meses. Hallamos diferencias estadísticamente significativas al comparar la media de tiempo en meses hasta el inicio de la terapia, que en los pacientes CD38- fue significativamente mayor al de los CD38+ (Tabla 47). Por edades, encontramos diferencias en los grupos de mayores de 65 años y en el de 50 a 65 años, siendo el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el primer tratamiento mayor en los pacientes CD38-; sin embargo en el grupo de menores de 50 años se quedó en una tendencia ($p = 0.052$). Por otro lado, hallamos diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos grupos con el número de meses de seguimiento, de manera que en los pacientes CD38- este valor fue significativamente mayor que en los CD38+ (Tabla 48). La misma diferencia se observó en el grupo de pacientes de 50 a 65 años y en el de mayores de 65 años, no así en el grupo de menores de 50 años.

Tabla 45. Comparación de la necesidad de tratamiento en función de la expresión del Ag CD38.

Tratamiento	CD38 (n = 264)	
	Neg	Pos
Sí (n = 130)	37.8%	68%
No (n = 134)	62.2%	32%

$p = 0.0001$

Tabla 46. Comparación los distintos tipos de tratamiento en función de la expresión del Ag CD38.

Esquemas de tratamiento	CD38 (n = 116)	
	Neg	Pos
Alquilantes	63.65%	40.98%
Esquemas con fludarabina	29.09%	32.78%
PoliQT (CHOP, COP,...)	1.81%	21.31%
Bendamustina/Pentostatina	5.45%	4.93%

$p = 0.007$

Tabla 47. Comparación del n° de meses desde el diagnóstico hasta el primer tratamiento en función de la expresión del Ag CD38.

CD38	n	Media (meses)	ES
Positivo	68	17.48	21.54
Negativo	61	37.47	46.29

p = 0.003

Tabla 48. Comparación del n° de meses de seguimiento en función de la expresión del Ag CD38.

CD38	n	Media (meses)	ES
Positivo	100	53.47	38.28
Negativo	164	77.95	51.68

p = 0.0001

5.3.6. EXPRESION DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE CD38 Y SUPERVIVENCIA.

De nuestra serie de 303 pacientes, 192 continúan vivos y 76 han fallecido. De los 35 restantes desconocemos su evolución dado que no continuaron acudiendo a la visita médica. En cuanto a la supervivencia hallamos diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos al comparar la expresión del Ag CD38, de forma que los pacientes CD38- tuvieron una supervivencia significativamente mayor que los CD38+ (82,3% frente a un 65%; p = 0.0001) (Figura 76) (Tabla 49). El análisis también se desglosó por grupos de edades obteniendo el mismo resultado, con la excepción del grupo de edad menores de 50 años, ya que la supervivencia de estos pacientes más jóvenes CD38- fue del 100% durante el tiempo que duró el seguimiento en nuestra serie.

Figura 76. Supervivencia global en función de la expresión del Ag CD38 ($p = 0.0001$).

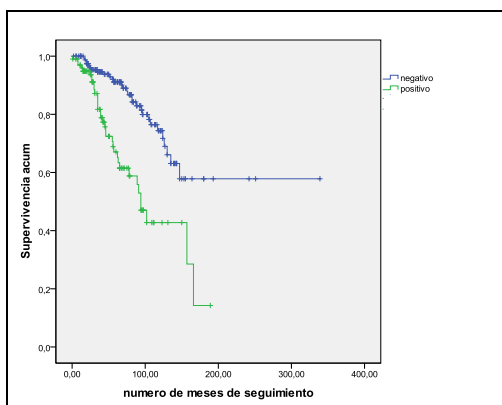


Tabla 49. Comparación del estatus vital en función de la expresión del antígeno CD38 ($P = 0.001$).

CD38 (n = 245)	Negativo	Positivo
Vivo	81.16%	61.53%
Muerto	18.84%	38.47%

5.4. PROTEINA TIROSIN-KINASA ZAP70.

Como hemos comentado previamente, en Enero del año 2.004 se inicia la determinación de la proteína tirosin-kinasa ZAP70 mediante citometría de flujo, siendo realizada en 196 pacientes. Se han identificado dos grupos de pacientes en función de la expresión de esta proteína: ZAP+ y ZAP70-, habiéndose establecido el punto de corte en un 20%. El porcentaje de pacientes ZAP70+ fue de un 44.6% frente a un 55.4% de pacientes ZAP70- (Tabla 8) (Fig. 25). En este apartado hemos comparado ambos grupos con las diferentes variables, obteniendo los resultados que se muestran a continuación:

5.4.1. EXPRESION DE LA PROTEINA ZAP70 Y VARIABLES CLINICO-BIOLÓGICAS.

En cuanto al análisis de las variables clínico-biológicas cualitativas no se han observado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a sexo, presencia de adenopatías, existencia de hepatoesplenomegalia, estadio clínico, TDL, alteración en el proteinograma, test de Coombs directo o cifra de $\beta 2$ -microglobulina. Tampoco observamos diferencias al estudiar las siguientes variables cuantitativas: edad al diagnóstico, ácido úrico, porcentaje de linfocitos patológicos, Hb, leucocitos, linfocitos, neutrófilos, plaquetas, LDH, $\beta 2$ -microglobulina, PT, IgG, IgA, IgM, PCR, VSG, meses

de seguimiento y meses hasta el primer tratamiento. Tan sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de doblaje linfocitario que fue significativamente menor en los pacientes ZAP70+.

5.4.2. EXPRESION DE LA PROTEINA ZAP70 Y PATRON DE INFILTRACION EN LA BIOPSIA OSEA.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos patrones de infiltración ósea ni al estudiarlos de forma independiente ni al agruparlos en 2: difuso y no difuso.

5.4.3. EXPRESION DE LA PROTEINA ZAP70 Y ESTUDIO INMUNOFENOTIPICO.

Al analizar ambos grupos de pacientes no se observó una relación estadísticamente significativa entre la expresión de la proteína ZAP70 y el *score* inmunofenotípico propuesto por el grupo de Matutes. Como hemos comentado en el apartado anterior, al comparar la proteína ZAP70 con la expresión del antígeno CD38 no hemos observado significación estadística.

5.4.4. EXPRESION DE LA PROTEINA ZAP70 Y ESTUDIO CITOGENETICO.

No hallamos una relación estadísticamente significativa al comparar la expresión de la proteína ZAP70 y la presencia o no de alteración cromosómica o con el tipo de aberración mediante citogenética convencional. Sin embargo, sí que encontramos diferencia estadísticamente significativa al comparar ambos grupos con los resultados de los estudios de hibridación in situ, de manera que, en los pacientes ZAP70+ el porcentaje de alteraciones cromosómicas fue mayor que en los ZAP70- (Tabla 50). Al analizar cada una de las alteraciones posibles por separado únicamente observamos una diferencia significativa en la delección 17p. A diferencia de lo que ocurre con el Ag CD38, en nuestra serie la delección 17p se presentó solo en los pacientes ZAP70+ ($p = 0.045$) (Tabla 51).

Al igual que ocurría con CD38, al agrupar las alteraciones en 3 grupos citogenéticos de riesgo encontramos diferencias significativas ($p = 0.039$), siendo las alteraciones del grupo favorable más frecuentes en los pacientes ZAP70- y las del grupo desfavorable en los ZAP70+. En el grupo de riesgo intermedio, la expresión de ZAP70 fue similar (Tabla 52).

Tabla 50. Comparación de anomalías cromosómicas por FISH en función de la expresión de ZAP70.

FISH	ZAP70 (n = 136)	
	Neg	Pos
FISH normal	67.16%	46.37%
FISH anormal	32.84%	53.63%

p = 0.014

Tabla 51. Comparación de la delección 17p en función de la expresión de ZAP70.

Del 17p	ZAP70 (n = 136)	
	Neg	Pos
Sí	0%	5.79%
No	100%	94.21%

p = 0.045

Tabla 52. Comparación de grupos de riesgo CCy/o FISH en función de la expresión de ZAP70.

Grupos citogenéticos	ZAP70 (n = 158)	
	Neg	Pos
Favorable	81.57%	68.3%
Intermedio	14.47%	15.85%
Desfavorable	3.96%	15.85%

p = 0.039

5.4.5. EXPRESION DE LA PROTEINA ZAP70 Y TRATAMIENTO.

Se compararon ambos grupos, ZAP70+ y ZAP70-, no observando una relación estadísticamente significativa entre la expresión de la proteína ZAP70 y la necesidad de requerir algún tipo de tratamiento a lo largo del periodo de seguimiento. Tampoco se apreciaron diferencias en cuanto a las líneas de tratamiento, ni a haber recibido o no tratamiento con fludarabina, y/o al distribuir a los pacientes en los 4 grupos de tratamiento descritos previamente.

Tampoco hallamos diferencia estadísticamente significativa al comparar ambos grupos con el número de meses de seguimiento o con el número de meses transcurridos desde el diagnóstico de la enfermedad hasta el inicio del tratamiento.

5.4.6. EXPRESION DE LA PROTEINA ZAP70 Y SUPERVIVENCIA.

Al analizar las curvas de supervivencia no hallamos diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes ZAP70+ y los ZAP70-.

5.5. LINFOCITOSIS MONOCLONAL B DE SIGNIFICADO INCIERTO EN NUESTRA POBLACION.

De los 303 pacientes diagnosticados de LLC-B en el periodo 1.991-2.009, se seleccionaron 171 con criterios de LBM o LLC estadio 0 de la clasificación de Rai (linfocitosis aislada, sin adenopatías, visceromegalias o citopenias). Se estudiaron los siguientes factores pronóstico clínicos y biológicos: edad, sexo, parámetros del hemograma, β 2-microglobulina (β 2M), expresión de ZAP70 y/o CD38, y alteraciones citogenéticas agrupadas en los 3 grupos de riesgo descritos anteriormente: favorable (deleción 13q, FISH y/o citogenética convencional normal); intermedio (trisomía 12, deleción 6q y/o 1 ó 2 alteraciones en el cariotipo) y desfavorable (deleción 11q, deleción 17p y/o cariotipo complejo). Evaluamos la relación de estas variables al diagnóstico con la evolución de la enfermedad: estatus vital, duplicación linfocitaria y tiempo al primer tratamiento.

De los 156 pacientes valorables con LBM o LLC estadio 0, el recuento absoluto de linfocitos en sangre periférica en el momento del diagnóstico fue predictivo de la necesidad de recibir tratamiento ($p < 0,0001$) y 10.000 ($/\mu\text{L}$) linfocitos totales fue el umbral capaz de identificar a los pacientes que requerían tratamiento de aquellos con enfermedad estable (AUC: 0.796, sensibilidad 78%, especificidad 63.5%; $p = 0.0001$). En base a este umbral dividimos a los pacientes en 2 grupos: Grupo A: pacientes con una cifra de linfocitos totales en sangre periférica menor de 10.000 ($/\mu\text{L}$) ($n=82$) y Grupo B: pacientes con una cifra de linfocitos totales en sangre periférica mayor de 10.000 ($/\mu\text{L}$) ($n=74$) en el momento del diagnóstico (Tabla 53).

No hubo diferencias en cuanto a edad, sexo, β 2M, Hb, plaquetas, ZAP70, CD38 y alteraciones citogenéticas. Por contra, sí encontramos diferencias significativas entre ambos grupos respecto al tiempo de duplicación linfocitaria (Figura 77) durante el seguimiento (Grupo A versus B: 22 pacientes versus 42, $p = 0.0001$). También, en cuanto a la necesidad de tratamiento (Grupo A versus Grupo B: 9 pacientes versus 32, $p = 0.0001$) (Figura 78), no así en cuanto a la supervivencia global (Grupo A versus Grupo B, $p = 0.16$).

Tabla 53. Características de los sujetos incluidos en el análisis.

Variable	Grupo A < 10.000 (/μL) n = 82	Grupo B >10.000 (/μL) n = 74
Sexo varón	38 (46.3%)	43 (58.1%)
Edad al diagnóstico	69 (41-91)	64 (40-86)
β2microglobulina	2.17 (1.0-6.4)	2 (1.12-4.5)
Linfocitos (x10 ⁹ /L)	7.2 (3.6-9.8)	14.9 (10-97.4)
Hemoglobina (g/dL)	13.9 (11-16.9)	14 (11-17.5)
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	200 (102-994)	195 (100-379)
CD38+ al diagnóstico	14/75 (18.6%)	17/66 (25.7%)
ZAP70+ al diagnóstico	24/50 (48%)	22/52(42.3%)
Citogenética convencional y/o FISH		
Favorable	47/58 (81.1%)	41/52 (78.8%)
Intermedio	4/58 (6.8%)	9/52 (17.4%)
Desfavorable	7/58 (12.1%)	2/52 (3.8%)
Duplicación linfocitaria (nº de pacientes)	22/79 (27.8%)	42/69 (60.86%)
Tratamiento (nº de pacientes)	9/82 (7.3%)	32/74 (20.2%)
Exitus	6/82 (7.3%)	15/74 (20.27%)

Cuando evaluamos los factores predictivos de la necesidad de tratamiento en el Grupo A, que correspondía mayoritariamente a pacientes actualmente reclasificados como LBM, las variables que resultaron significativas fueron: el recuento linfocitario (HR 1,0; 95% CI: 1.000-1.001; p = 0.037), la citogenética desfavorable (HR 11,0; 95% CI: 1.2-114.1; p = 0.03) y la expresión de CD38 (HR 5.74; 95% CI: 1.2-25.9; p = 0.02) (Figura 79). Sin embargo, en el análisis multivariante sólo la expresión de CD38 mantuvo significación estadística (HR 16,04; 95% CI: 1.4-182.6; p = 0.02). Por último, la tasa estimada de progresión a LLC que requiere tratamiento entre los sujetos del Grupo A fue 1.4% por año.

Figura 77. Tiempo hasta la duplicación linfocitaria en función del recuento linfocitario mayor o menor a 10.000 (/ μ L); ($p=0.0001$).

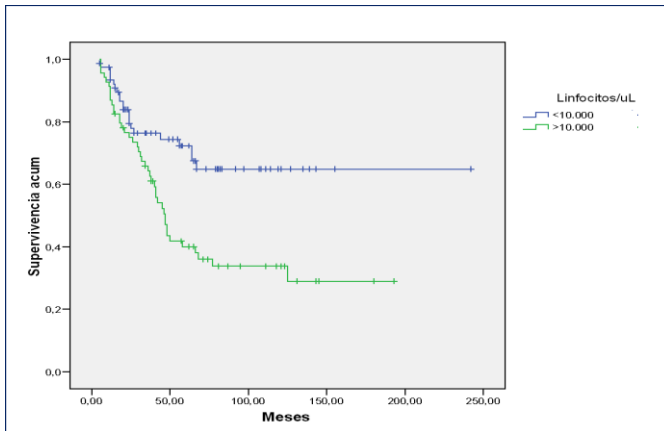


Figura 78. Tiempo hasta el primer tratamiento en función del recuento linfocitario mayor o menor a 10.000 (/ μ L); ($p=0.0001$).

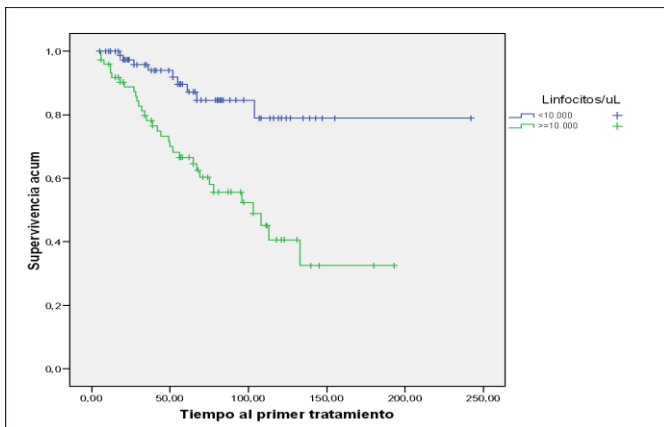
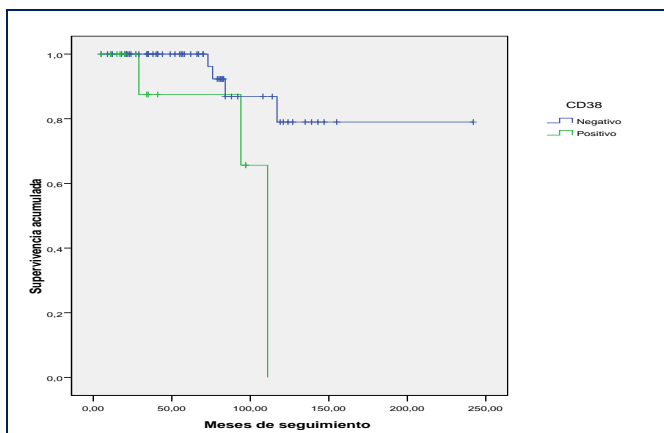


Figura 79. Tiempo al primer tratamiento en los pacientes con menos de 10.000 linfocitos en función de la expresión de CD38 al diagnóstico; ($p = 0.02$).



5.6. NOMOGRAMA E INDICE PRONOSTICO EN NUESTRA POBLACION.

De los 303 pacientes diagnosticados de LLC-B en nuestra serie, se seleccionaron 152 que reunían todos los requisitos para ser incluidos en la construcción de nuestro nomograma e índice pronóstico (IP). Se evaluaron datos clínicos (sexo, edad, presencia de adenopatías y/o hepatoesplenomegalia, estadio clínico según el estadiaje de Rai y Binet, necesidad de recibir tratamiento, tiempo hasta el primer tratamiento, número de líneas de tratamiento recibidas a lo largo de la evolución de la enfermedad y el estatus vital) y datos biológicos (cifra de hemoglobina, leucocitos, linfocitos y plaquetas en el momento del diagnóstico, tiempo de doblaje linfocitario, creatinina, urato, bilirrubina total y directa, FA, LDH, VSG, PCR, β 2-microglobulina, proteínas totales, albúmina, IgG, IgA, IgM, proteinograma, test de Coombs directo, patrón de infiltración en la biopsia ósea, score inmunofenotípico, expresión del Ag de superficie CD38 y de la proteína tirosinkinasa ZAP70 y por último el estudio citogenético: citogenética convencional (CC) y/o FISH en el momento del diagnóstico. Las alteraciones citogenéticas fueron agrupadas en los 3 grupos de riesgo: favorable (n= 114), intermedio (n =22) y desfavorable (n= 16).

En las Tablas 54 y 55 se exponen las características generales, cualitativas y cuantitativas, de los 152 pacientes incluidos en el estudio. El 57.2% fueron varones frente a un 42.8% mujeres. La mediana de edad al diagnóstico fue 66 años (rango: 32-86 años). El mayor porcentaje de pacientes (56.6%) tenía más de 65 años, seguido de un 30.9% que tenían entre 50 y 65 años, y solo un 12.5% eran menores de 50 años.

La mediana de supervivencia global estimada fue de 147 meses (95%CI, 127.27-166.72). Se analizó la supervivencia acumulada, en meses, desde el momento del diagnóstico hasta el fallecimiento del enfermo o la fecha de cierre del estudio siendo de un 80.9% (Figura 80). Excluyendo a 2 pacientes en los que se perdió el seguimiento, el 79.6% de los pacientes estaban vivos frente a un 19.1% que fallecieron a lo largo del periodo de seguimiento. La primera causa de muerte en nuestros pacientes fue la sepsis (42.3%) seguida de las segundas neoplasias (15.4%). Estas segundas neoplasias (incluyendo tumores sólidos y hematológicos) se presentaron en 36 pacientes (23.7%), siendo los más frecuentes los tumores cutáneos (10/37; 27%) y los linfomas (5/37; 13.5%). La media de tiempo de seguimiento fue de 61.68 meses, la mediana de 54 meses. Durante este periodo el 49.3% de los pacientes (75/152) no precisaron tratamiento a lo largo de la evolución de la enfermedad frente a un 50.7% (77/152) que sí. La media de meses transcurridos desde el diagnóstico de la enfermedad hasta el inicio del primer tratamiento en aquellos que lo precisaron fue 24.84 meses.

Tabla 54. Características de las variables cualitativas de los sujetos incluidos en el análisis.

Variable	N	%
Edad < 50 años 50-65 años >65 años	19/152 47/152 86/152	12.5 30.9 56.6
Sexo Varón Mujer	87/152 65/152	57.2 42.8
Adenopatías No Menos de 3 3 o más de 3	90/152 36/152 26/152	59.2 23.7 17.1
Esplenomegalia No Si	129/152 23/152	84.9 15.1
Hepatomegalia No Si	139/152 13/152	91.4 8.6
Estadio (Rai) 0 I II III IV	84/152 34/152 26/152 4/152 4/152	55.3 22.4 17.1 2.6 2.6
Estadio (Binet) A B C	116/152 28/152 8/152	76.3 18.4 5.3
TCD Negativo Positivo	132/136 4/136	97.1 2.9

Tabla 54. Características de las variables cualitativas de los sujetos incluidos en el análisis.

Variable	N	%
TDL No alcanzado Alcanzado	78/145 67/145	53.8 46.2
Proteinograma Normal Monoclonal Hipogammaglobulinemia	118/150 10/150 22/150	78.7 6.7 14.7
Score IF (Matutes) 2 3 4 5 6	8/152 23/152 32/152 70/152 19/152	5.3 15.1 21.1 46.1 12.5
CD38 Negativo Positivo	92/152 60/152	60.5 39.5
CD38/ ZAP70 Ambos negativos Uno de ellos positivo Ambos positivos	49/152 67/152 36/152	32.2 44.1 23.7
Patrón de infiltración ósea Nodular Nódulo-intersticial Intersticial Difuso Normal	10/101 59/101 13/101 11/101 8/101	9.9 58.4 12.9 10.9 7.9
Citogenética convencional y/o FISH Favorable Intermedio Desfavorable	110/152 26/152 16/152	72.4 19.1 10.5

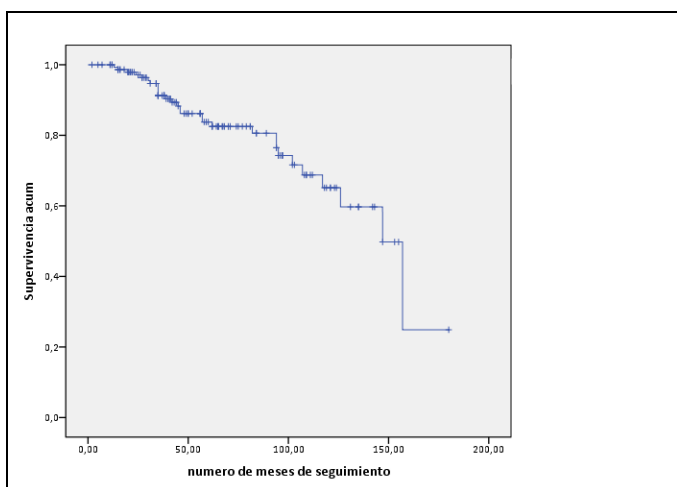
Tabla 54. Características de las variables cualitativas de los sujetos incluidos en el análisis.

Variable	N	%
Tratamiento		
No	75/152	49.3
Si	77/152	50.7
Estatus vital		
Vivo	123/150	80.9
Muerto	29/150	19.1

Tabla 55. Características de las variables cuantitativas de los sujetos incluidos en el análisis.

Variable	Mediana (Rango)	P25	P75
Edad (años)	66 (32-86)	58	72
Hb (g/dL)	14 (5.7-17.4)	13	14.6
Leucocitos (x10 ³ /μL)	16125 (7300-221000)	12615	28275
Linfocitos (x10 ³ /μL)	11150 (2800-159000)	7525	20300
Plaquetas (x10 ³ /μL)	191500 (19700-333000)	154250	225000
Cr (mg/dL)	0.98 (0.55-2.26)	0.83	1.1
Urato (mg/dL)	6 (2.1-11.5)	4.9	6.8
Ca (mg/dL)	9.25 (6-10.8)	9	9.69
BT (mg/dL)	0.6 (0.12-2.5)	0.48	0.8
BD (mg/dL)	0.2 (0.1-2.1)	0.14	0.61
GPT (u.int/L)	20 (6.5-84)	16	25
LDH (g/L)	330 (101-1405)	275.75	384
FA (u.int/L)	172 (10-516)	128	211
PT (g/L)	70 (50-128)	67.25	73
Alb (g/L)	44 (28-56)	42	47
IgG (mg/dL)	879 (350-8180)	710	1040
IgA (mg/dL)	164 (19-934)	111	218
IgM (mg/dL)	57 (3-699)	39	105
β2M (mg/dL)	2.201 (1-8.3)	1.75	3.175
VSG (mm/h)	10 (1-100)	5	22
PCR (mg/L)	5 (1-72)	3	5

Figura 80. Supervivencia acumulada de nuestra serie de pacientes.



El análisis univariante fue realizado para identificar las variables clínico-biológicas que se correlacionaban con la supervivencia (Tabla 56). Cuando estudiamos la variable sexo, ésta no se relacionó con la supervivencia. Por el contrario, la edad fue un predictor significativo para la misma, no alcanzándose la mediana de supervivencia en los pacientes menores de 50 años y en aquellos que tenían entre 50 y 65 años; mientras que en el grupo de mayores de 65 años fue de 117 meses (Figura 81). Como veremos más adelante en el desarrollo del nomograma, nuestro punto de corte para la edad fueron los 65 años, definiendo dos grupos en lugar de tres. Esta separación en 65 años se ajustaba más a la media de edad de nuestros enfermos. La mediana de supervivencia estimada para los estadios de Rai fue: 157 meses para el estadio 0 (95%CI, 101.02-212.98), 126 meses para el estadio I (95%CI, 91.11-160.88), 147 meses para el estadio II (95%CI, 127.37-162.62), 94 meses para el estadio III (95%CI, 53.49-134.5) y 35 meses para el estadio IV (95%CI, 12.54-57.45). El sistema de estadiaje de Binet también se correlacionó con la supervivencia siendo la mediana de supervivencia estimada de 157 meses en el estadio A (95%CI, 113.24-200.75), 147 meses en el estadio B (95%CI, 127.37-162.62) y 45 meses en el estadio C (95%CI, 37.42-52.57). Dado que los sistemas de Rai y Binet sólo difieren en los estadios intermedios, decidimos incluir en nuestro análisis los estadios de Rai modificados siguiendo las recomendaciones del International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (Zwiebel JA. y Cheson BD.; 1.998) (Figura 82), que a diferencia de los del MDACC se ajustaban mejor a los estadios de Binet (grupo de bajo riesgo Rai 0-1 = A de Binet, grupo de riesgo intermedio II de Rai = B de Binet, grupo de alto riesgo III-IV de Rai = C de Binet). La expresión de CD38 también fue un predictor significativo para la supervivencia en nuestra serie, al igual que la asociación CD38/ZAP70, de manera que la mediana de supervivencia fue de 102 meses tanto para los pacientes CD38+ como para los CD38+/ZAP70+;

no alcanzándose en el resto: CD38-, CD38-/ZAP70-, CD38+/ZAP70- y/o CD38-/ZAP70+ (Figura 83). Con respecto a las alteraciones citogenéticas, la mediana de supervivencia en el grupo de riesgo favorable no fue alcanzada; en el intermedio fue 126 meses (95%CI, 106.96-145.03) y en el desfavorable 46 meses (95%CI, 3.3-88.69) (Figura 84). En cuanto a las variables cuantitativas fueron significativas: la cifra de linfocitos (estratificada en 3 grupos: menor de 20.000; entre 20.000 y 50.000; y mayor de 50.000) (Figura 85), el recuento de plaquetas y, el valor de la LDH y de la β 2-microglobulina.

Tabla 56. Desarrollo del nomograma: variables incluidas en el análisis univariante.

Variable	RR	95%IC	p
Edad (años)	2.222	1.1.5-4.468	0.016
Sexo	0.784	0.361-1.703	0.539
Adenopatías	2.362	1.534-3.638	0.000
Esplenomegalia	0.232	0.106-0.507	0.000
Hepatomegalia	0.224	0.082-0.610	0.003
Rai	2.181	1.614-2.947	0.000
Binet	2.977	1.875-4.726	0.000
Hb (g/dL)	0.876	0.716-1.070	0.195
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1.0	1.000-1.000	0.330
Linfocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1.87	1.080-3.236	0.025
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1.0	1.000-1.000	0.005
LDH (g/L)	1.002	1.001-1.003	0.005
B2M (mg/dL)	1.0	1.000-1.001	0.000
TCD	0.378	0.088-1.623	0.191
CD38	4.302	1.966-9.414	0.000
ZAP70	1.656	0.750-3.657	0.212
CD38/ZAP70	2.058	1.259-3.362	0.004
Score IF	0.043	0.517-0.990	0.043
CC y/o FISH	2.412	1.503-3.872	0.000

Figura 81. Supervivencia en función de los grupos de edad.

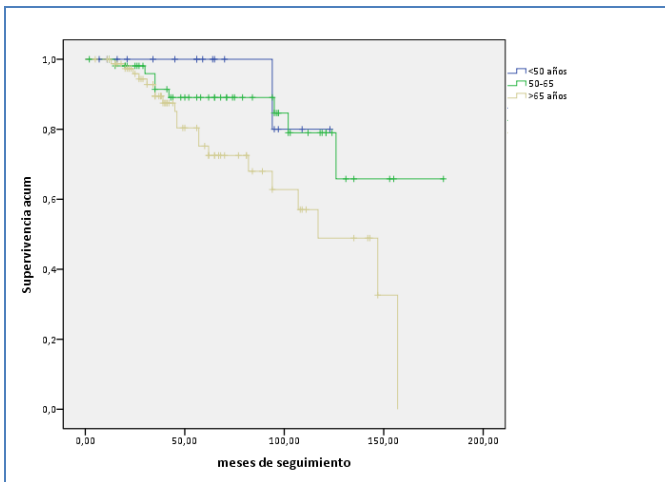


Figura 82. Supervivencia en función del estadio Rai modificado.

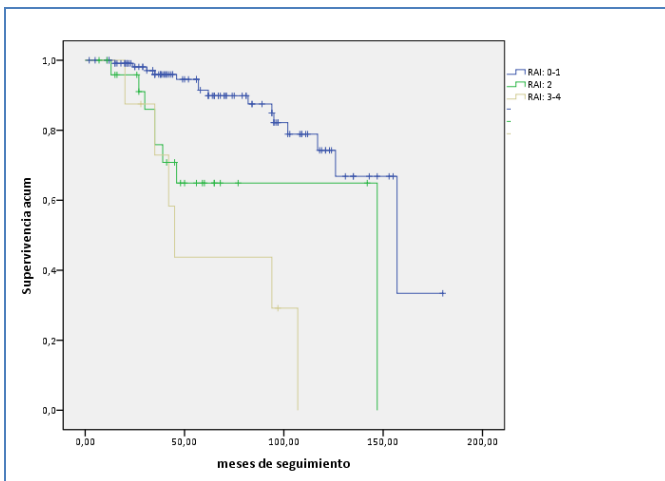


Figura 83. Supervivencia en función de la expresión de CD38/ZAP70.

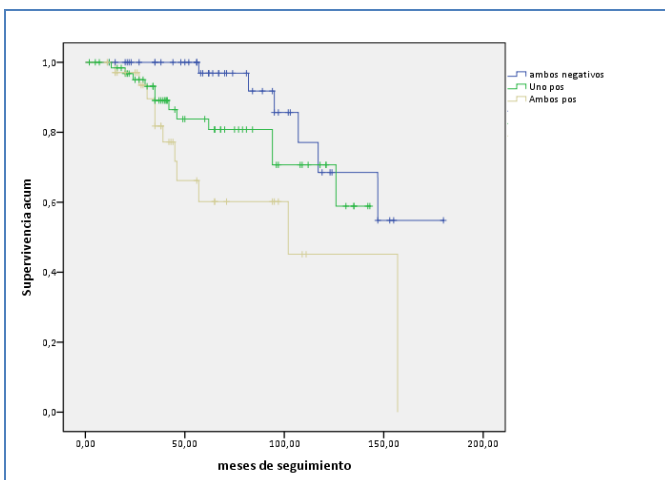


Figura 84. Supervivencia en función de los grupos de riesgo por CC y/o FISH.

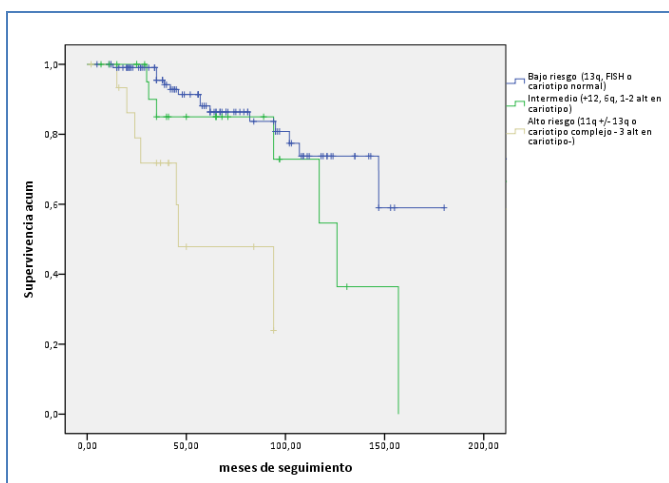
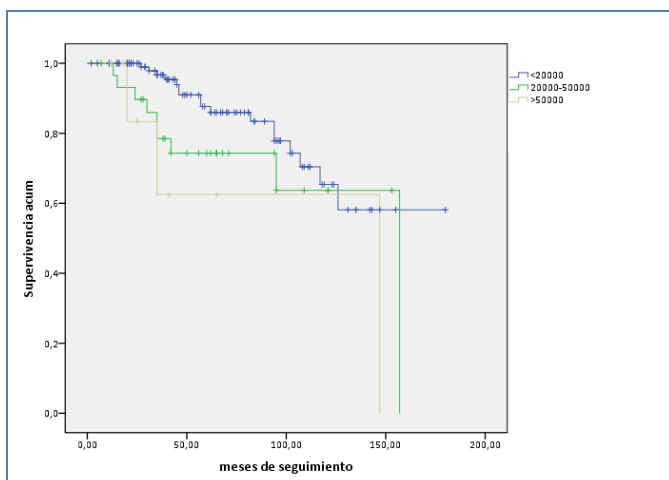


Figura 85. Supervivencia en función de la cifra de linfocitos estratificada (< 20.000, 20-50.000 y > 50.000/ μ L).



La regresión multivariante se llevó a cabo para analizar la relación de variables independientes con la supervivencia global. Se incluyeron los 152 pacientes y se realizó una modelización Cox multivariante con las 12 variables candidatas resultantes del análisis univariante: edad, estadio de Rai, B2M, linfocitos, citogenética convencional, FISH, CD38, ZAP70, hepatomegalia, LDH, score inmunofenotípico y plaquetas. La Tabla 57 indica el mejor modelo después de eliminar las variables que no fueron estadísticamente significativas. Dado que el tamaño de la muestra era pequeño se consideró como nivel de significación para entrar el de 0.2.

A continuación, el nomograma fue desarrollado para predecir la supervivencia siguiendo la metodología descrita por Iasonos y cols, usando para ello las 5 variables independientes identificadas en el análisis multivariante: edad (menor o igual a 65 años vs mayor de 65 años); estadiaje de Rai (0-I, II y III-IV); cifra de linfocitos (menor de 20.000; entre 20.000 y 50.000; y mayor de 50.000); CC y/o FISH (favorable, intermedio y desfavorable) y CD38/ZAP70 (CD38-/ZAP70-; CD38+/ZAP70- o CD38-/ZAP70+; y CD38+/ZAP70+). La fórmula para calcular la puntuación del nomograma fue: RAI x 50,0 + Citogenética convencional y/o FISH x 37,6 + CD38/ZAP x 30,8 + cifra de linfocitos x 30,0 + Edad x 33,0; y por ajuste de regresión lineal se obtuvo el algoritmo para establecer la mediana de supervivencia a partir de la puntuación del nomograma (Figura 86):

Mediana de supervivencia= 173.3249 - 0.5347 x Puntuación nomograma.

Porcentaje (%) de Supervivencia a los 5 años: 1.1085 - 0.0033 x Puntuación Nomograma.

La puntuación total del nomograma se utilizó para calcular la mediana de supervivencia y la probabilidad de supervivencia a los 5 años. La puntuación máxima que se podía alcanzar en el nomograma fue 329.8. La mediana de la puntuación del nomograma fue 63.8, y los percentiles 25 y 75 fueron 157 y 95 respectivamente.

Tabla 57. Desarrollo del nomograma: variables significativas en el análisis multivariante.

Variable	RR	95%IC	p
Edad	1.720	0.775-3.918	0.197
Rai	2.27	1.380-3.734	0.001
Linfocitos	1.635	0.944-2.834	0.08
Cg convencional y/o FISH	1.852	1.051-3.263	0.03
CD38 y ZAP70	1.657	0.938-2.926	0.082

El índice pronóstico se estableció a partir de las 5 variables previamente identificadas (Tabla 58). A cada variable se asoció una puntuación y para cada sujeto se calculó la suma de puntos, lo que denominamos score IP. La puntuación total varió de 0 a 9 puntos. Se dio 0 puntos cuando el paciente presentaba edad menor de 65 años, cifra de linfocitos menor de 20.000, estadios 0 y I de Rai, citogenética convencional y/o FISH de bajo riesgo o CD38-/ZAP70-; 1 punto si edad mayor de 65 años, cifra de linfocitos entre 20.000 y 50.000, estadio II de Rai, citogenética convencional y/o FISH de riesgo intermedio o CD38+/ZAP70- o viceversa; y 2 puntos si cifra de linfocitos mayor de 50.000, estadios III y IV de Rai, citogenética convencional y/o FISH de alto riesgo o CD38+/ZAP70+. Se establecieron 3 grupos de riesgo: bajo (de 0 a 2 puntos), intermedio

(de 3 a 4 puntos) y alto (de 5 a 9 puntos) (Tabla 59). La mediana de supervivencia fue: no alcanzada para el grupo con índice pronóstico bajo, de 147 meses para el grupo con índice pronóstico intermedio y de 42 meses para el grupo con índice pronóstico alto (95% CI, 25.773-58.227), siendo la diferencia estadísticamente significativa (0.0001) (Figura 87).

Figura 86. Supervivencia global de nuestra serie a los 5 años.

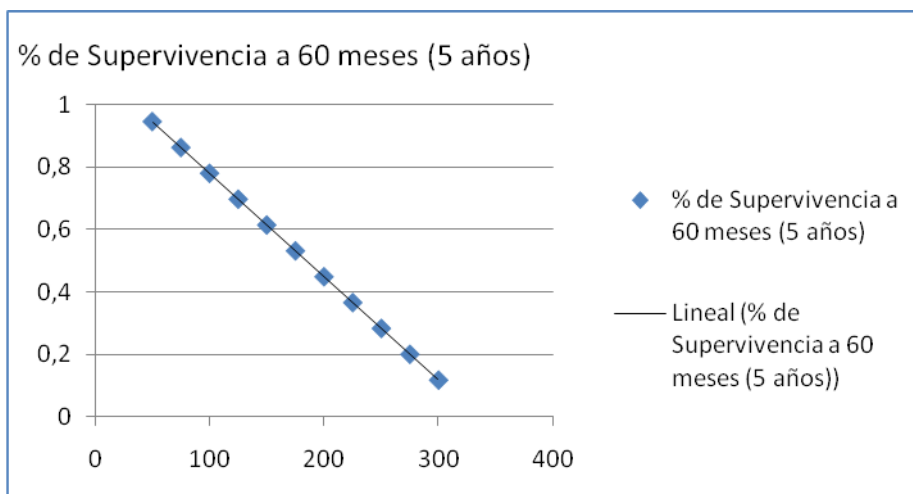


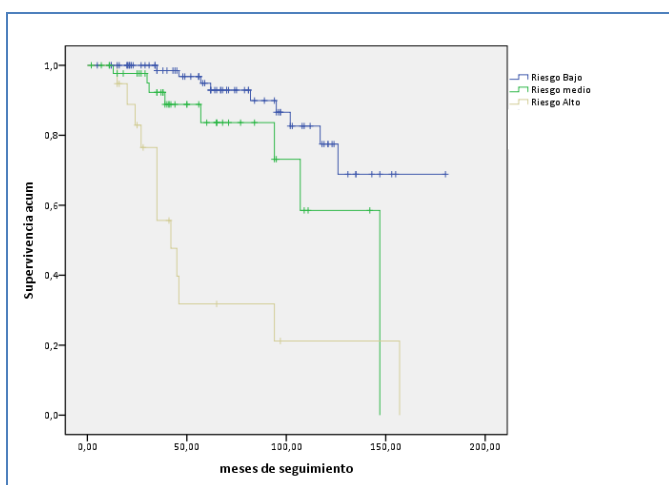
Tabla 58. Índice pronóstico basado en la presencia de los 5 factores de riesgo en nuestra serie.

Variable	Puntuación		
	0	1	2
Edad	≤ 65 años	>65 años	
Linfocitos	<20.000	20.000-50.000	> 50.000
Estadio Rai	0-I	II	III-IV
CC y/o FISH	Bajo riesgo	Intermedio	Alto
CD38/ZAP70	CD38-/ZAP70-	CD38+/ZAP70- o viceversa	CD38+/ZAP70+

Tabla 59. Supervivencia global y riesgo relativo de muerte en función de los 3 grupos de riesgo resultantes de nuestro IP.

Grupo de riesgo	Indice IP	Nº de pacientes	Probabilidad de SV a los 5 años	Probabilidad de SV a los 10 años	RR	95% CI
Bajo	0-2	86	0.949 (0.29)	0.775 (0.078)	1	
Intermedio	3-4	48	0.702 (0.115)	0.562 (0.156)	2.816	1.107-7.167
Alto	5-9	18	0.350 (0.134)	0.223 (0.131)	9.990	4.034-24.752

Figura 87. Supervivencia estimada en función de los 3 grupos de riesgo resultantes de nuestro IP (Kaplan-Meier).



La supervivencia estimada en nuestra población fue del 80.9%. Con una mediana de seguimiento de 54 meses (2-180), no ha fallecido ninguno de los 20 pacientes que tenían una puntuación-score de 0 y sólo 3 de ellos han recibido tratamiento. De los 152 pacientes han fallecido 29 (19.1%): 9/86 (10.4%) en el grupo de bajo riesgo; 9/48 (18.75%) en el grupo de riesgo intermedio y 11/18 (61.1%) en el grupo de riesgo alto, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0001$). De los 86 pacientes incluidos en el grupo de bajo riesgo fallecieron 9, y sólo 2 pacientes murieron a causa de la LLC (a los 3.8 y 9.7 años del diagnóstico). Los otros 7 pacientes 3 lo hicieron de una segunda neoplasia y 4 de causas no relacionadas con la LLC. De los 48 pacientes incluidos en el grupo de riesgo intermedio según nuestro IP, 6 se clasificarían en el grupo de bajo riesgo y 3 en el de alto riesgo según el grupo del MDACC. Exceptuando un paciente en el que se perdió el seguimiento, 5 de los 6 clasificados en el grupo de bajo riesgo según el grupo

MDACC están vivos, habiendo recibido 2 de ellos tratamiento. Por el contrario, 2 de los pacientes del grupo de alto riesgo según el grupo MDACC murieron a causa de la enfermedad. En ambos se detectó evolución clonal, presentando como alteración cromosómica la delección 17p, una como alteración única y otra asociada a la delección 13q. De los 18 pacientes incluidos en el grupo de alto riesgo según nuestro IP, 11 de ellos, de los cuales 7 han fallecido, se clasificarían dentro del grupo de riesgo intermedio según el grupo del MDACC. De estos 7 fallecidos 2 murieron a causa de la LLC, 1 por segunda neoplasia y 2 de causas no relacionadas con la LLC. En los 2 restantes desconocemos la causa. Los 11 pacientes habían recibido tratamiento para la enfermedad: 6/11 clorambucil, 3/11 fludarabina, 1/11 FCR y 1/11 ciclofosfamida. Del total de pacientes fallecidos en los 3 grupos pronóstico, el 46.2% estaban en progresión. La principal causa de muerte fue la infecciosa (sepsis – 42.3% - y neumonías – 11.5%) seguida de las segundas neoplasias (tumores sólidos y hematológicos).

De los 152 pacientes, 77 (50.7%) recibieron tratamiento a lo largo del periodo de seguimiento: 30/86 (34.8%) en el grupo de bajo riesgo, 29/48 (60.4%) en el de riesgo intermedio y 18/18 (100%) en el de alto riesgo, siendo también la diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0001$). La mediana de tiempo estimada hasta el primer tratamiento fue 35 meses (28.29-41.71) para el grupo de bajo riesgo, 9 meses (0-19.54) para el intermedio y 1 mes para el grupo de alto riesgo ($p=0.001$). En cuanto al número de líneas de tratamiento recibidas no observamos diferencias entre los 3 grupos de riesgo. Tampoco a haber recibido o no tratamiento con fludarabina. Sin embargo al agrupar a los pacientes en 4 grupos (alquilantes, esquemas con fludarabina, poliquimioterapia tipo CHOP o COP y bendamustina/pentostatina), encontramos que los pacientes del grupo de bajo riesgo fueron tratados con esquemas de fludarabina en un porcentaje mayor (15/27; 55.5%) que los pacientes del grupo de riesgo intermedio y alto que fueron tratados con alquilantes (11/26; 42.3% y 6/15; 40% respectivamente ($p=0.007$)).

Para finalizar nuestro análisis, procedimos a la validación del nomograma mediante la generación de un índice de concordancia, el cual indicaba la probabilidad que de dos pacientes elegidos al azar, el que moría primero tuviera la mayor probabilidad de muerte. Para ello se estableció un coeficiente de concordancia (CC) inicial: 0,751232; I.C. al 95.00% [0.7062, 0.7925]; y por remuestreo Jackknife se obtuvo un estimador no sesgado del mismo 0,74137; I.C. al 95.00%: [0.6959, 0.7833]. Comparamos la puntuación de nuestro índice pronóstico con la puntuación del índice propuesto por Wierda, tomando como referencia la escala de riesgo de Rai tricotomizado (riesgo bajo: valor Rai 0-I; riesgo intermedio: valor Rai II; y riesgo alto: valor Rai III-IV). Todos los índices (nuestro IP, IP MDACC y Rai tricotomizado) presentaban 3 niveles (bajo, intermedio y alto). Empleamos 4 medidas de concordancia frente al índice Rai: % de valores concordantes, D de

Sommers, coeficiente Rho de Spearman y el coeficiente de correlación intraclase (Tabla 60). Nuestro índice correlacionaba mejor que el índice MDACC frente a la estadificación de riesgo de Rai, presentando una concordancia del 67.7% frente al 36.8% del MDACC.

Tabla 60. Resumen de los resultados de la comparación de nuestro IP y el IP del MDACC con la estadificación pronóstica de RAI.

Medida	IP	MDACC
% de valores concordantes	67.7%	36.80%
D de Sommers	0.667	0.38
Rho de Spearman	0.567	0.353
Coeficiente de correlación intraclase	0.749	0.401

DISCUSSION

6. DISCUSION.

La leucemia linfática crónica B es el tipo de leucemia más frecuente en el mundo occidental y principalmente afecta a individuos de edad avanzada aunque una tercera parte de pacientes son menores de 60 años al diagnóstico. Esta entidad tiene una gran variabilidad en su historia natural con una supervivencia global que va de meses a décadas. En los últimos años se han producido considerables avances en el tratamiento, desarrollandose medidas altamente efectivas como la inmunquimioterapia y potencialmente curativas como el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (mieloablatoivo y de intensidad reducida) (Dreger P. y cols, 2.007; Sorror ML. y cols, 2.008; Delgado J. y cols 2.009; Kharfan-Dabaja MA. y cols, 2.012). Sin embargo, muchos pacientes fallecen a consecuencia de la enfermedad. Por otro lado, la caracterización de nuevos marcadores biológicos con implicación pronóstica (CD38, ZAP70 y estado mutacional de las IgVH), ha definido de una manera más precisa subgrupos dentro de esta entidad. A pesar de todo esto, el diagnóstico del conjunto de los pacientes con LLC-B sigue presentando una apreciable falta de homogeneidad lo que, como consecuencia, tiene su repercusión en el seguimiento y la actitud terapéutica. Por lo tanto, parece evidente que la estratificación de los pacientes a partir de la combinación de varios marcadores pronóstico sería crucial para desarrollar una guía de actuación terapéutica y ajustar la intensidad de los nuevos tratamientos al pronóstico de los pacientes (Zenz T. y cols, 2.012). No obstante, aunque existe un gran interés por distintos grupos de trabajo, hasta ahora ha sido imposible de establecer. De igual manera, la identificación de nuevos marcadores pronóstico y el estudio futuro de alteraciones moleculares relacionadas con el curso clínico de la enfermedad nos ayudará a desarrollar un plan terapéutico de una forma individualizada, seleccionando en el momento del diagnóstico que pacientes se beneficiarían de un tratamiento precoz o más agresivo, sobre todo en el caso de los pacientes jóvenes.

6.1. FACTORES PRONOSTICO EN LA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA B.

Inicialmente se identificaron diversos factores, al diagnóstico, que influyen en la supervivencia de los pacientes con LLC-B, como son: la presentación clínico/ biológica (Rai y Binet), el tiempo de duplicación linfocitario, la cifra de β 2-microglobulina o el patrón de infiltración óseo. Estos factores son importantes, sobre todo el estadio clínico, a la hora de tomar decisiones e iniciar un tratamiento, pero no pueden predecir el curso clínico de la enfermedad.

A continuación el grupo de Catovsky y Matutes propuso en 1.994 un *score* inmunofenotípico, basado en cinco marcadores, posteriormente ampliado a seis, con un elevado

rendimiento para la discriminación de subgrupos clínicos y útil para facilitar el diagnóstico diferencial con otros síndromes linfoproliferativos tales como la tricoleucemia o la leucemización del linfoma del manto, linfoma marginal, linfoma esplénico o linfoma folicular. De esta manera, pacientes que presentaban un *score* inmunofenotípico más alto tenían mejor pronóstico que aquellos con un *score* más bajo (Matutes E. y cols, 1.994; Moreau EJ. y cols, 1.997).

Más recientemente se ha demostrado que las alteraciones citogenéticas son relevantes en la patogenia y clínica de la LLC-B. En este sentido es de destacar que la aplicación de técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia no solo ha mejorado el rendimiento de la citogenética convencional, elevando el porcentaje de pacientes con alteraciones cromosómicas hasta alrededor del 80% de los casos, sino que además ha demostrado que las alteraciones más frecuentes (del13q, del11q, +12, del6q y del17p) tienen implicación pronóstica, independientemente del estadio clínico (Döhner H. y cols, 2.000). Aunque a diferencia de otras enfermedades hematológicas como la LMC y algunos linfomas, en la LLC no hay una única alteración citogenética que defina la enfermedad, es posible que los genes localizados en 11q y 13q puedan tener un ascenso común (Auer RL. y cols, 2.007). Además, durante el curso de la enfermedad pueden ser adquiridas nuevas alteraciones cromosómicas por el clon leucémico, produciendo algunas de ellas un cambio en el curso clínico de la enfermedad siendo éste más agresivo (Fegan C. y cols, 1.995; Finn WG. y cols, 1.998; Shanafelt M. y cols, 2.006, Delgado J. y cols, 2.012).

Un importante avance en el conocimiento de la biología de la LLC-B fue el descubrimiento de Damle y Hamblin en 1.998 que demostraba la existencia de 2 formas distintas de LLC-B en relación a su origen ontogénico: una forma pre-germinal, en la que los genes IgVH no están mutados y otra post-germinal, en la que las células han entrado en contacto con antígenos experimentando mutaciones en los genes de las IgVH adquiriendo memoria inmunológica. Se ha demostrado que ambas formas tienen un pronóstico diferente, siendo peor en las formas no mutadas. Sin embargo, Tobin G. y cols en el año 2.002 han descrito un subtipo de LLC-B con una mutación a nivel de la región VH3-21 cuyo pronóstico es similar al grupo que no presenta la mutación. Esto implicaría una respuesta antígeno-específica que puede conferir una conducta biológica diferente entre pacientes con mutación de los genes de las IgVH. Otro estudio realizado por E. Sarsotti y cols en 2.004 también ha identificado un subgrupo de pacientes, estadio A de Binet, con alteraciones en el gen BCL-6 que tiene un alto riesgo de progresión a pesar de la presencia de mutaciones en los genes de IgVH. Por otro lado, dos trabajos (Ferrarini M. y Chiorazzi N., 2.004; Chiorazzi N. y cols, 2.005) han sido publicados en los últimos años subrayando que tanto en la forma mutada como en la no mutada, las células de origen son linfocitos que han estado en contacto previo con el antígeno; y estos autores también han postulado que las

propiedades celulares y la estimulación antigénica pueden dictar el tipo de expansión clonal y determinar el curso clínico de la enfermedad, produciendo alteraciones en la proliferación celular que se encuentra influenciada por factores inductores y promotores. Dado que la técnica para la determinación del estado mutacional de IgVH es compleja y costosa se han planteado otros parámetros que proporcionan información pronóstica y técnicamente son más asequibles, tales como el estudio del antígeno de superficie CD38 y de la proteína tirosin-kinasa ZAP-70, determinados mediante citometría de flujo. En este sentido, varios estudios han evaluado la relación entre las alteraciones citogenéticas, el estado mutacional de las IgVH y la expresión del Ag CD38 o ZAP70. Basándose en la combinación de estos marcadores se ha intentado realizar una estratificación de riesgo de progresión de la enfermedad (Kröber A. y cols, 2.002; Dewald GW. y cols, 2.003; Kröber A. y cols, 2.006; Gachard N. y cols, 2.008).

A finales de la década de los noventa, a partir de diferentes investigaciones, entre ellas las realizadas por Damle en 1.999, Hamblin y Domingo-Domenech en 2.002, se llegó a la conclusión que el antígeno de superficie CD38 era un marcador pronóstico independiente, cuya expresión se relacionaba con una supervivencia global y libre de tratamiento más cortas, aunque sobre su valor pronóstico definitivo persisten ciertas incógnitas, como comentaremos más adelante.

Estudios con microarrays pusieron de manifiesto que las formas mutadas y no mutadas de LLC-B expresan básicamente los mismos genes, independientemente del estado mutacional de los genes de IgVH, lo que implicaría que hay una célula de origen común y/o un mecanismo que permite la transformación leucémica. En esta línea, los trabajos realizados por Rosenwald A. y cols en 2.001 y Chen L. y cols en 2.002 confirmaron que la expresión de unos pocos genes, y particularmente de ZAP-70, permitía distinguir las formas mutadas (con baja expresión de ZAP-70) de las no mutadas (con marcada expresión de ZAP-70) y al ser constante en el tiempo podía ser utilizada al diagnóstico para identificar pacientes con un mayor riesgo de progresión.

Además de todos los estudios mencionados, destacan también los trabajos de Del Giudice I. y cols y Schroers R. y cols en 2.005 en los que definen dos subgrupos de pacientes de LLC-B: unos cuyas células expresan CD38 y ZAP70, no presentan la mutación de los genes de IgVH y tienen un mal pronóstico y otros, que no expresan, o lo hacen en un porcentaje bajo, CD38 y ZAP70, presentan la mutación de los genes de IgVH y tienen un curso clínico indolente. Ambos representan los dos extremos opuestos, existiendo un tercer grupo donde se produciría una combinación de estos tres marcadores, sin poder ser incluido en los grupos mencionados anteriormente y, cuyo pronóstico no estaría definido, siendo necesarios estudios adicionales para la estandarización y evaluación de esos marcadores y su implicación en el manejo de los pacientes con LLC-B.

En los últimos años han surgido nuevos e importantes avances en la biología molecular e inmunobiología de la LLC-B publicados por Ferrarini M. y Chiorazzi N., en 2.004 y Chiorazzi N. y cols en 2.005 que ponen en entredicho la hipótesis hasta ahora aceptada sobre el origen pre-germinal en las formas no mutadas y post-germinal en las mutadas de la célula leucémica y que en la patogenia de la enfermedad existe un fallo en el mecanismo de apoptosis. Así, se ha implicado al RCB en la génesis de esta enfermedad proponiendo que la expansión clonal es debida a una estimulación antigénica de este receptor que, junto a células del microambiente y citoquinas, son un factor promotor del desarrollo de células leucémicas.

Estos hallazgos vienen a apoyar nuestra hipótesis de trabajo de que difícilmente un parámetro aislado permitiría establecer de manera categórica el pronóstico, y que para este objetivo parecería más recomendable combinar diversos parámetros.

En nuestra serie, el análisis univariante ratificó el valor pronóstico individual de muchos de los parámetros encontrados previamente en otros estudios.

6.1.1. Características clínico-biológicas.

Al considerar las variables pronósticas relacionadas con la presentación clínica, la presencia de adenopatías y hepatoesplenomegalia fueron signos de mal pronóstico, alcanzándose diferencias estadísticamente significativas. También el estadio clínico avanzado según las 2 clasificaciones: Rai y Binet, tuvo una influencia negativa sobre la supervivencia, al igual que en las series originales (Rai KR, 1975; Binet JL, 1977; Binet JL, 1981; Rai KR, 1990). En general, estadios tempranos o pacientes de bajo riesgo (Rai 0, Binet A) tienen una mediana de supervivencia de más de 10 años y habitualmente no precisan tratamiento. Este grupo comprende aproximadamente el 80% de los pacientes de nuevo diagnóstico de LLC. Los pacientes en categorías de riesgo intermedio (Rai I/II, Binet B) tienen una supervivencia global de aproximadamente 7-9 años. El tratamiento está indicado en los pacientes de alto riesgo (Rai III-IV, Binet C) y la supervivencia se reduce a 2-4 años desde el diagnóstico.

En nuestra serie, no se alcanzó la mediana de supervivencia en los estadios 0 de RAI y A de Binet. Analizando uno por uno, la media de supervivencia para los estadios de Rai fue: 19.5 años para el estadio 0, 10.7 años para el estadio I, 7.6 años para el estadio II, 6.6 años el III; y 5.2 años el estadio IV. El sistema de estadiaje de Binet, más frecuentemente utilizado en Europa, también correlacionó con la supervivencia, siendo la media estimada de 18.8 años en el estadio A, 7.8 años en el B y 5.8 años en el estadio C. El aumento de supervivencia observado en los grupos de alto riesgo (Rai III-IV, Binet C), está en consonancia con lo publicado por Abrisqueta y colaboradores

del Hospital Clínico de Barcelona en 2.009. Tras analizar 929 pacientes diagnosticados de LLC en dos periodos de tiempo (1.980 a 1.994 y 1.994 a 2.004) observaron un incremento de la supervivencia, fundamentalmente en los pacientes más jóvenes y con enfermedad avanzada, sugiriendo que los nuevos tratamientos pueden estar cambiando el pronóstico de esta enfermedad.

Otros factores clínicos y demográficos como la edad y el sexo han mostrado afectar al pronóstico (Catovsky D. y cols, 1.989; Rai KR. y cols, 1.975; Binet JL. y cols, 1.977), aunque la magnitud y significancia de éstos independientemente del estadio no concuerdan en todas las series (Zwiebel J. y cols, 1.998). En nuestro trabajo, el sexo no llegó a tener influencia en la supervivencia; pero sí la edad, de manera que a mayor edad menor supervivencia global.

Múltiples factores determinados en el laboratorio se relacionan con el curso clínico de la enfermedad. Varios estudios han encontrado que niveles séricos de CD23, sTK y β 2M pueden predecir la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión (Sartafi M. y cols, 1.996; Hallek M. y cols, 1.999; Tsimberidou AM. y cols, 2.007). En el presente trabajo, los niveles de Hb, leucocitos, linfocitos, plaquetas, albúmina, BD, Ca, LDH y β 2 microglobulina al diagnóstico de la enfermedad, fueron factores que influyeron en la supervivencia de los pacientes.

En el momento actual no está claramente establecido el punto de corte de la cifra de linfocitos en valor absoluto que lo defina como factor pronóstico. En nuestro estudio la cifra de linfocitos se analizó: en primer lugar como una variable cuantitativa y, en un segundo tiempo como cualitativa al desarrollar el índice pronóstico, estableciendo 3 grupos con implicación pronóstica ($<20.000/\mu\text{L}$, $20.000-50.000/\mu\text{L}$ y $>50.000/\mu\text{L}$). En ambos casos, el recuento linfocitario estuvo inversamente relacionado con la supervivencia de los pacientes.

En cuanto a la cifra de β 2 microglobulina en nuestra población también se relacionó significativamente con la supervivencia global, corroborando los resultados obtenidos en otras series (Keating MJ. y cols, 1.995; Wierda WG. y cols, 2.007) siendo menor la supervivencia conforme mayor era la cifra de β 2 microglobulina (Keating MJ. y cols, 1.995).

En referencia al TDL, varios estudios (Montserrat E. y cols, 1.986; Molica S. y cols; 1.987; Vallespi T. y cols, 1.991) han demostrado su valor pronóstico. Así un TDL mayor de 12 meses implicaría buen pronóstico, y por el contrario, un TDL menor de 12 meses sería más frecuente en los casos agresivos. En nuestra serie el TDL también alcanzó significación estadística con respecto a la supervivencia, de manera que los pacientes con TDL mayor presentaban una supervivencia significativamente mayor.

Por último, al igual que en los artículos publicados por Dearder C. y cols en 2.008 y Xu W. y cols en 2.009, el TCD también fue un factor predictor negativo en relación a la supervivencia en nuestro grupo. Dicha determinación se realizó en 231 pacientes siendo el porcentaje de pacientes

con TCD positivo (14.8%) similar al de otras series (Mauro FR. y cols, 2.000; Barcellini W. y cols, 2.006; Dearder C. y cols, 2.008). La anemia hemolítica autoinmune se observó en un sólo paciente al diagnóstico de la enfermedad (1.48%). Desafortunadamente, no registramos el valor del TCD durante la evolución de la enfermedad o antes del inicio de un tratamiento para determinar el porcentaje exacto de pacientes que desarrollaron una AHAI a lo largo de la evolución de la LLC.

6.1.2. Características histopatológicas.

Se conocen diferentes patrones histológicos de afectación de la médula ósea en LLC-B. Se ha señalado la existencia de una relación entre el patrón de afectación medular y el pronóstico, siendo evidente la repercusión negativa del patrón difuso sobre la supervivencia cuando se compara con el resto de patrones (Rozman y Montserrat, 1.984; Geisler C. y cols, 1.986). Nuestro estudio confirma lo descrito anteriormente, siendo la diferencia observada entre el patrón difuso y cualquier otro tipo de patrón estadísticamente significativa, motivo por lo que siempre que las condiciones del paciente lo permitan continuamos llevando a cabo un estudio medular completo en el diagnóstico de la LLC. No obstante, trabajos recientes (Bergmann MA. y cols, 2.007) sugieren que el valor pronóstico de la biopsia ósea podría ser reemplazado por los nuevos marcadores pronóstico, cuestionando incluso su realización al diagnóstico de la enfermedad.

Para concluir este apartado, los pacientes con un patrón de infiltración tipo intersticial en nuestra serie presentaban la mayor supervivencia, a diferencia de lo publicado hasta ahora donde es el patrón nodular el que se ha relacionado con supervivencias más prolongadas. Esta discrepancia puede ser debida, al menos en parte, a diferencias en la interpretación de la biopsia ósea por parte de los anatomopatólogos.

6.1.3. Características inmunofenotípicas.

Al igual que los estudios realizados por Matutes E. en 1.994 y Moreau EJ. en 1.997 en los cuales pacientes con un *score* inmunofenotípico más alto tenían mejor pronóstico que aquellos con un *score* más bajo, nosotros también hemos encontrado la misma relación siendo estadísticamente significativa entre el *score* y la supervivencia global.

6.1.4. Características citogenéticas.

Aunque el cariotipo es indispensable para la detección de anomalías cromosómicas complejas en LLC-B, los estudios de citogenética convencional están limitados por el bajo índice mitótico de las células neoplásicas. Esta limitación es superada con la aplicación de técnicas de hibridación in situ con fluorescencia, que detectan entre un 77-80% de anomalías (Döhner H. y cols, 2.000; Dewald GW. y cols, 2.003). Recientemente se ha estudiado la utilidad de un nuevo mitógeno en citogenética convencional, DSP30, siendo éste eficaz y permitiendo la detección de anomalías cromosómicas en más del 80% de los pacientes (Dicker F. y cols, 2.006; Haferlach C. y cols, 2.007). Los resultados de aplicar dicha técnica citogenética con mitógenos parecen ser casi tan sensibles como los de la técnica FISH para la detección de la delección 11q y la trisomía 12; y algo menores para la delección 13q. Además, con este nuevo agente, DSP30, se encontraron anomalías adicionales en el 50% de los pacientes con delección 13q aislada detectada por FISH (Kotkowska A. y cols, 2.011).

En el caso que nos ocupa, el estudio citogenético se realizó en el 51.2% de los pacientes incluidos en nuestra serie tanto por citogenética convencional como por FISH. Por citogenética convencional y en consonancia con otros autores (Reddy KS., 2.006), el 30% de los estudios presentaban alteraciones cariotípicas, siendo la anomalía cromosómica más frecuente la trisomía 12, seguida de la delección 13q y la delección 11q. El 50.92% (55/108) de los pacientes que no presentaban ninguna alteración cromosómica por citogenética convencional, tampoco las presentaban por hibridación in situ. Este grupo tenía una mediana de supervivencia de 147 meses y en su mayoría (74%) eran CD38-. A diferencia del trabajo publicado por Döhner H. y cols en el año 2.000 donde las alteraciones cromosómicas detectadas por FISH estaban en torno al 80%, nosotros sólo fuimos capaces de detectar un 42.6% de anomalías cromosómicas. Al igual que lo descrito por otros autores (Döhner H. y cols, 2.000; Reddy KS., 2.006), la alteración más frecuente encontrada en nuestros pacientes por FISH fue la delección 13q y en una frecuencia similar (45.5%), seguido de la trisomía 12 también en un porcentaje similar (28.8%). Igualmente la del13q fue la anomalía que más se asoció a otras alteraciones citogenéticas. Al igual que en las series de Matutes y cols (Matutes E. y cols, 1.996; Oscier DG. y cols 1.997; Matutes E. y Polliack A., 2.000), la presencia de la trisomía 12 se asoció a morfología atípica, score inmunofenotípico más bajo (11/20; 55%) y a la expresión de CD38 (16/20; 80%). Aunque en nuestra población, a diferencia de la de Döhner, la delección 11q fue la tercera y no la segunda en frecuencia, sí que se presentó en los pacientes CD38+ en un porcentaje significativamente mayor al de los CD38- (9/12; 75%) (Dewald GW. y cols, 2.003;

Haferlach C. y cols 2.007). Únicamente la deleción 17p se asoció con la expresión de ZAP70, como comentaremos más adelante.

Recientemente, (Rigolin GM. y cols, 2.012) en pacientes con FISH normal al diagnóstico en los que se habían utilizado técnicas de citogenética con nuevos mitógenos, se consiguió identificar un pequeño subgrupo de pacientes con alteraciones cariotípicas. Este subgrupo se ha asociado con un score inmunofenotípico bajo, estadíos avanzados y necesidad de iniciar el tratamiento más precozmente. En nuestra serie, fueron muy pocos los pacientes que entraron dentro de este subgrupo y, por lo tanto, no pudimos corroborar dichos hallazgos.

La supervivencia en nuestro estudio fue significativamente mayor en los pacientes sin alteraciones cromosómicas detectadas por FISH. En contra de los hallazgos obtenidos en el clásico trabajo de Döhner H. y cols, fuimos incapaces de demostrar diferencias significativas en la supervivencia global entre las distintas alteraciones cromosómicas detectadas por FISH, lo que probablemente fue debido al reducido número de casos. Sin embargo, al agrupar las alteraciones citogenéticas en 3 grupos (favorable: deleción 13q, FISH y/o citogenética convencional normal; intermedio: trisomía 12, deleción 6q y/o 1 ó 2 alteraciones en el cariotipo; y desfavorable: deleción 11q, deleción 17p y/o cariotipo complejo) sí que objetivamos diferencias con implicación pronóstica y terapéutica, de manera que la supervivencia fue menor en los pacientes del grupo desfavorable (59,1%), seguido del intermedio (67,7%) y del favorable (81,7%) y por contra la necesidad de tratamiento fue mayor en los pacientes del grupo desfavorable, seguido del intermedio y por último el favorable. En nuestra opinión, estos resultados y los de otros autores (Juliusson G., 1.986; Dicker F. y cols, 2.006; Haferlach C. y cols, 2.007), refuerzan la importancia de seguir realizando estudios cariotípicos con o sin mitógenos en la LLC-B.

La adquisición de nuevas alteraciones cromosómicas detectadas por citogenética convencional durante el curso de la enfermedad es un fenómeno relativamente poco frecuente pero cuya incidencia se incrementa con la aplicación de las técnicas de FISH. Chevalier y cols en 2.002 observaron una evolución clonal en 13 de 31 casos con LLC-B después de una media de seguimiento de 83 meses. En este estudio no se constató asociación entre la presencia de nuevas alteraciones citogenéticas con la expresión de CD38 o con progresión de la enfermedad aunque la adquisición de del17p se asoció con muerte en 7 de 11 casos. Posteriormente, Shanafelt y cols en 2.006 confirmaron que se producía un incremento de los casos que sufrían evolución clonal al aumentar el tiempo de seguimiento (27% después de 5 años) y además, que este fenómeno estaba asociado a la expresión de ZAP-70. En adición, Stilgenbauer en 2.007 encontró relación entre la evolución clonal no sólo con el estado mutacional de las IgVH, sino también con el desarrollo de resistencia al tratamiento y con una menor supervivencia, constituyendo un factor pronóstico

independiente. Más recientemente, en 2.012, Delgado J. y cols del Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC)/ Grupo Español de Citogenética Hematológica (GECGH) observaron asociación entre la delección 17p y la adquisición de nuevas anomalías citogenéticas. En nuestra serie, el 47.7% de los pacientes adquirieron nuevas alteraciones cromosómicas durante el curso de la enfermedad. Al igual que Stilgenbauer, encontramos relación entre la evolución clonal con la supervivencia, de manera que ésta fue menor al adquirir nuevas anomalías cromosómicas. También constatamos que dicho fenómeno se relacionaba con una mayor necesidad de líneas de tratamiento. Por el contrario, no encontramos asociación con la expresión de ZAP70 y sí con la expresión de CD38 al agrupar la evolución clonal en 2 categorías: no evolución clonal y/o adquisición de del13q aislada vs adquisición de otras anomalías cromosómicas diferentes a del13q. Finalmente, debido al reducido número de casos no fuimos capaces de demostrar una mayor adquisición de nuevas anomalías cromosómicas durante el curso de la enfermedad en el grupo de pacientes que portaban la delección 17p como cabría esperar.

6.1.5. Tratamiento.

Con los avances en el conocimiento de la patogenia de la enfermedad y el desarrollo de nuevas armas terapéuticas no es atrevido preguntarnos si la LLC-B es una enfermedad curable o si sería necesario tratar pacientes jóvenes con estadios precoces sin necesidad de esperar a la progresión. Además la caracterización de nuevos marcadores biológicos con implicación pronóstica ha permitido definir subgrupos de una manera más precisa. Aunque no existe aún una estratificación de pacientes, si que se está haciendo un gran esfuerzo por varios grupos de trabajo en desarrollar un índice pronóstico en función de los diferentes marcadores pronóstico y, por consiguiente una guía de actuación terapéutica. En los últimos años, la inmunoterapia ha sido el tratamiento más eficaz, desarrollándose multitud de combinaciones (Tam CS. y cols, 2.008; Hallek M. y cols, 2.009; Bosch F. y cols, 2.009; Hernández JA. y cols, 2.010). En algunos casos, regímenes combinados como FCR podrían incluso revertir el pronóstico adverso de alteraciones citogenéticas como es el caso de la delección 11q (Tsimberidou AM. y cols, 2.009). En consecuencia, la Guía Americana del NCCN del año 2.011 ya establece 3 grupos de tratamiento en función de las diferentes alteraciones citogenéticas: pacientes con del11q, pacientes con del17p y/o P53 y, por último, aquellos que no se encuentran en los 2 grupos anteriores.

Destacar que en nuestra serie los tratamientos administrados no fueron homogéneos, al igual que tampoco lo fueron los criterios para el inicio de éstos en los pacientes diagnosticados en los primeros años, hasta que se estableció un protocolo de actuación terapéutica. Durante el periodo

de seguimiento, aproximadamente la mitad (50.8%) de los pacientes de nuestra serie no han precisado tratamiento a lo largo de la evolución de la enfermedad frente a un 49.2% que sí. La media de tratamientos recibidos ha sido de 2.1 (1-9) y la mediana de 2 (1-3). La mayoría de pacientes que recibieron tratamiento no necesitó más de tres líneas (67.1%) frente a un porcentaje más pequeño (32.9%) que sí. Por otra parte solo 6 de nuestros pacientes, todos ellos menores de 60 años, fueron sometidos a trasplante de PHSP, un autólogo, cinco alogénicos (3 de ellos de intensidad reducida) y un trasplante de cordón. Uno de ellos fue sometido a 2 trasplantes: primero autólogo y posteriormente de cordón, a pesar de lo cual falleció de la enfermedad. Los demás pacientes sometidos a trasplante alogénico PHSP se encuentran en remisión completa, lo que viene a confirmar la eficacia terapéutica del trasplante en esta entidad, constituyendo la única alternativa realmente curativa para estos pacientes (Dreger P. y cols, 2.007; Dreger P. y cols, 2.010).

En nuestra serie, hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre el estatus vital y la necesidad de recibir tratamiento, de manera que, en el grupo de pacientes fallecidos el porcentaje de pacientes tratados fue superior al de los no tratados. También se objetivó que los pacientes que morían habían recibido más líneas de tratamiento que aquellos que seguían vivos. Además, la media de meses pasados desde el diagnóstico hasta el inicio del primer tratamiento en el grupo de pacientes vivos fue mayor que en el de los fallecidos.

En cuanto a los distintos esquemas de tratamiento, en aquellos pacientes que habían recibido esquemas con fludarabina y poliquimioterapia (CHOP, COP), el porcentaje de pacientes vivos era mayor que en los que habían recibido alquilantes, pentostatina o bendamustina. No obstante, aunque la diferencia resultó significativa, no podemos darle validez puesto que tanto los criterios de inicio de tratamiento como el tipo de tratamiento han sido muy heterogéneos. No observamos diferencias en las curvas de supervivencia entre los 4 grupos de tratamiento. Tampoco hubo diferencias en la supervivencia libre de tratamiento al comparar el grupo de pacientes que habían recibido esquemas con fludarabina frente a los que no, a diferencia de la mayoría de estudios donde sí que se ha observado (Keating MJ. y cols, 1.998; Dillman RO. y cols, 1.989; Rai KR. y cols, 2.000). Aunque es obligado señalar que por la época en la que transcurrió el estudio fueron pocos los pacientes tratados con el esquema FCR. Desde la publicación de los resultados del Grupo Alemán GCLLSG (Tam CS. y cols, 2.008) nuestro estándar de tratamiento de pacientes jóvenes (\leq 65 años) sin comorbilidades es FCR.

Con una mediana de seguimiento de 5 años, excluyendo 35 casos en los que se perdió el seguimiento, fallecieron aproximadamente una cuarta parte de los pacientes (28.36%), siendo las principales causas de muerte los procesos infecciosos (sepsis, neumonías, infección por CMV), seguidas de progresión de la enfermedad, y en tercer lugar a consecuencia de la aparición de

segundas neoplasias (Callea V. y cols, 2.006; Ravandi F. y O'Brien S, 2.006; Thurmes P. y cols, 2.008; Tam CS. y cols, 2.008; Gribben J., 2.010; Morton LM. y cols, 2.010). Está descrita una mayor incidencia de segundos tumores en pacientes con LLC-B destacando, a diferencia de otros procesos linfoproliferativos, el incremento de los cánceres de pulmón y los melanomas (Morton LM. y cols, 2.010). En nuestra población, las segundas neoplasias, (incluyendo tumores sólidos y hematológicos) se presentaron en el 22.4%, siendo los más frecuentes los tumores cutáneos incluidos los melanomas, seguidos de los linfomas (3 de ellos transformaciones a Síndrome de Richter) y en tercer y cuarto lugar los cánceres de pulmón y de próstata en una frecuencia similar. Dentro de las neoplasias hematológicas las más frecuentes fueron los linfomas, seguidas de síndromes mielodisplásicos-mieloproliferativos y por último, las gammapatías monoclonales y el mieloma múltiple.

6.2. ANTIGENO DE SUPERFICIE CD38.

La expresión del antígeno CD38 identifica dos subgrupos de pacientes con LLC con diferente pronóstico (Damle RN. y cols, 1.999). Esta distinción está basada en el porcentaje de células leucémicas que expresan dicho antígeno y en la mayoría de estudios el umbral establecido es $\geq 30\%$ (Matrai Z., 2.005). Los dos subgrupos de pacientes que resultan de este cut-off difieren clínicamente en varios aspectos, incluyendo la supervivencia global (Damle RN. y cols, 1.999; Sherif Ibrahim y cols, 2.001; Jelinek DF. y cols 2.001), el tiempo al primer tratamiento (Durig J. y cols, 2.002), el número de células leucémicas con morfología atípica (Nowakowski GS. y cols, 2.009), la afectación adenopática (Sherif Ibrahim y cols, 2.001), los niveles de LDH y B2-microglobulina (Sherif Ibrahim y cols, 2.001; Domingo-Domenech E. y cols, 2.002), y el recuento absoluto de linfocitos en sangre periférica (Del Poeta G. y cols, 2.001).

Al igual que otros estudios, nuestro trabajo ha demostrado que la expresión del antígeno de superficie CD38 se relaciona con una supervivencia global y con una supervivencia libre de tratamiento más cortas (Damle RN. y cols, 1.999; Del Poeta G. y cols, 2.001; Ibrahim S. y cols, 2.001; Jelinek DF. y cols, 2.001; Morabito F. y cols, 2.001; Durig J. y cols, 2.002; Oliveira A. y cols, 2.011). Sin embargo persisten algunas incógnitas sobre su valor pronóstico definitivo. En un primer estudio se encontró que la expresión del antígeno CD38 poseía valor pronóstico similar al del estado mutacional de IgVH (Damle RN. y cols, 1.999). En este trabajo la expresión del antígeno CD38 era estable y no parecía modificarse con el tratamiento quimioterápico, hallazgo que ha sido apoyado por otros autores (Damle RN. y cols, 2.002; Durig J. y cols, 2.002; D'Árena y cols, 2.002). Por contra, otras publicaciones no confirman dicha correlación entre el antígeno CD38 y el estado

mutacional de IgVH (Sherif Ibrahim y cols, 2.001; Hamblin TJ.y cols, 2.002; Krober A. y cols, 2.002; Chan y Cleveland, 2.002; Chevallier P. y cols, 2.002). Pese a todo, la expresión del antígeno CD38 parece ser un importante factor pronóstico independiente en la mayoría de los artículos publicados (Damle RN. y cols, 1.999; Hamblin TJ. y cols 2.002).

Estudios sucesivos han obtenido resultados controvertidos tanto para la expresión del antígeno CD38 como para la proteína tirosin-kinasa ZAP-70, poniendo en entredicho que fueran factores pronóstico, por lo siguientes motivos:

1. Los datos obtenidos en diferentes laboratorios fueron distintos tanto para la determinación del antígeno CD38 como de la proteína ZAP70.
2. Los niveles de expresión del antígeno CD38 pueden cambiar a lo largo de la evolución de la enfermedad y también en relación a tratamientos u otros procesos intercurrentes (Sherif Ibrahim y cols, 2.001; Hamblin TJ. y cols, 2.002; Krober A. y cols, 2.002; Chan y Cleveland, 2.002; Chevallier P. y cols, 2.002). Un estudio reciente publicado por Ding W. y cols en 2.009 atribuye estos cambios a muchos parámetros, en particular a la estimulación de los receptores de superficie de las células por antígenos, citoquinas, etc del microambiente. Teniendo en cuenta ésto se debería considerar el nivel de expresión de CD38 como un indicador a tiempo real de los niveles de proliferación leucémica. Para otros autores (Damle RN. y cols, 1.999, Ghia P. y cols, 2.004) este cambio no sería tan relevante como para sobrepasar el límite que marca un mejor o peor resultado clínico.
3. Es necesaria una adecuada separación de células T para la determinación de la proteína ZAP70.
4. Los puntos de corte establecidos por los diversos grupos para distinguir casos positivos de negativos fueron diferentes tanto para la determinación del antígeno CD38 como para ZAP70, aunque actualmente el punto de corte parece estar consensuado en un 30 y 20% respectivamente, al menos en el ámbito clínico.
5. Por último y como hemos comentado en un apartado anterior, existe un 10-30% de casos que muestran resultados discordantes entre CD38/ ZAP70 y el estado mutacional de IgVH, es decir casos donde podemos encontrar la mutación de los genes de IgVH y las células leucémicas expresen CD38 y ZAP70 o viceversa.

A continuación pasamos a discutir los datos obtenidos en nuestro trabajo:

6.2.1. Características clínico-biológicas.

Los estudios realizados por Ibrahim en 2.001 y Ottaggio en 2.003 objetivaron que los pacientes que expresaban el Ag CD38 mostraban una tendencia a presentar hepato-esplenomegalia, afectación de un mayor número de áreas ganglionares, cifras más bajas de hemoglobina y elevación de β 2-microglobulina. Otro artículo publicado por Ghia y cols en 2.003, confirmó los mismos resultados en la cifra de Hb y de β 2-microglobulina en los pacientes CD38+, y además puso de manifiesto diferencias en la cifra de linfocitos y tiempo de doblaje linfocitario al comparar tres patrones de expresión del Ag CD38: negativo, positivo y bimodal. En nuestro estudio, en lo que a características clínico-biológicas se refiere, también encontramos diferencias estadísticamente significativas en la presencia de adenopatías y hepatoesplenomegalia al diagnóstico y en el estadio clínico según la clasificación de Rai y Binet, de manera que en los pacientes CD38- son más frecuentes los estadios más precoces que en los pacientes CD38+ donde son más comunes los estadios más avanzados. En cuanto a la cifra de hemoglobina, leucocitos y plaquetas al diagnóstico, no encontramos diferencias. En nuestra población, los pacientes CD38+ también mostraban un nivel de β 2microglobulina y LDH significativamente más elevados que los CD38-. Por último el tiempo de doblaje linfocitario fue significativamente diferente, siendo éste menor en los pacientes CD38+.

6.2.2. Características histopatológicas.

Al igual que en el trabajo realizado por Domingo-Domenech en 2.002, donde existe una significativa relación entre la expresión de CD38 y el patrón de infiltración ósea difuso, en nuestra serie, los pacientes CD38+ presentaron un patrón de infiltración difuso en un porcentaje significativamente mayor que los CD38- y como hemos comentado previamente este patrón está unido íntimamente con una menor supervivencia. No obstante, en nuestra serie, también hay casos discordantes donde a pesar de no expresar el antígeno CD38, presentan un patrón infiltrativo de mal pronóstico o viceversa, pacientes CD38+ presentan un patrón de infiltración de buen pronóstico.

6.2.3. Características inmunofenotípicas.

Hasta ahora no conocemos estudios en los que se haya investigado la relación entre el Ag CD38 y el *score* inmunofenotípico, pero sí la relación de este antígeno con algunos de los marcadores en los que se basa el *score* (CD22 y CD79b) y con la expresión de otros como CD39,

CD40, CD62L, CD69, CD71 y CD20 (Damle RN. y cols, 2.002; Manshoury T. y cols; 2.003). Así, en el primer trabajo se observó que los pacientes CD38+ expresaban un porcentaje significativamente mayor de CD40, CD69 y CD79b y una mayor intensidad de expresión de HLA-DR que los CD38-, no encontrando diferencias con el resto de marcadores estudiados entre ambos grupos. Más recientemente, Damle y cols en 2.007 encontraron que el compartimento de células leucémicas CD38+ coexpresaba más Ki67, lo que apoyaría la mayor activación y capacidad proliferativa atribuída a este subgrupo de LLC.

En el presente trabajo se ha estudiado la relación entre la expresión de CD38 y el score IF, encontrando que los pacientes CD38+ tienen un *score* significativamente más bajo que los CD38-. No obstante existe un subgrupo de pacientes (31.14%) donde existe discrepancia en estos resultados, es decir expresan CD38 pero tienen un *score* alto (22.64%) o viceversa (8.5%).

A diferencia de otros trabajos publicados (Del Giudice I. y cols, 2.005; Schroers R. y cols, 2.005; Gachard N. y cols, 2.008) donde la presencia simultánea de CD38 y ZAP70 se asocia a mal pronóstico, en nuestro estudio, ZAP70 no ha resultado ser factor pronóstico independiente y además no hemos sido capaces de encontrar relación entre la expresión del antígeno CD38 y la proteína tirosin-kinasa ZAP70. Esto puede ser debido al menor número de casos (n = 197) en los que se había llevado a cabo la determinación de esta proteína con respecto al número de determinaciones del Ag CD38 (n = 264); aunque se han señalado otras posibles explicaciones como la asociación con otros factores de mal pronóstico como la deleción 17p o la mutación de IgVH3-21, descritos en el estudio publicado por Kröber A. y cols en 2.006.

6.2.4. Características citogenéticas.

La correlación entre la expresión de CD38 y la presencia de alteraciones cromosómicas ha sido ampliamente estudiada. Chevallier y cols en el año 2.002 evaluaron el valor pronóstico de la expresión de CD38 y de las alteraciones cromosómicas en una serie de 125 pacientes, encontrando que la deleción 11q era la única alteración asociada a la LLC-B CD38+. También observaron una significativa correlación de la trisomía 12 con la progresión de la enfermedad pero no con la supervivencia. En ese mismo año, Oscier y cols mostraron que el estadio avanzado, el sexo masculino, la morfología atípica, el fenotipo CD38+, la trisomía 12, la deleción 11q, la pérdida o mutación del gen P53 y el estado no mutado de las IgVH eran factores de mal pronóstico en un análisis univariante, pero solo la pérdida o mutación del gen P53 y el estado no mutado de las IgVH conservaban significación pronóstica en un análisis multivariante. Sorprendentemente la deleción 11q no resultó ser factor pronóstico independiente. Posteriormente, Ottaggio en el año 2.003

observó una relación estadísticamente significativa entre la expresión del Ag CD38 y la presencia de alteraciones cromosómicas, aunque sin diferencias en términos de supervivencia. Lo que si se pudo constatar fue que los pacientes con pérdida en 17p experimentaban un curso clínico peor. Por último, Reddy KS en el año 2.006 sugiere una probable correlación entre la expresión de CD38 y la deleción 11q y, posiblemente también con la trisomía 12, hallazgos constatados por otros autores (Dewald GW y cols, 2003; Haferlach C y cols, 2007).

Nosotros hemos encontrado que en los pacientes CD38+ el porcentaje de alteraciones cromosómicas fue mayor que en los CD38-, tanto si habían sido determinadas por citogenética convencional como por FISH. Por este último método, la deleción 13q aislada fue significativamente más frecuente en los pacientes CD38- (17/27) mientras que la +12, del11q y del6q se dieron en mayor medida en los pacientes CD38+ (15/37, 3/37 y 1/37 respectivamente). Analizadas por separado, tanto la deleción 11q como la trisomía 12 se presentaron en los pacientes CD38+ en un porcentaje significativamente mayor al de los CD38-, hallazgos que están en consonancia con los resultados de los estudios previamente comentados. Como dato incongruente en nuestra serie y en otras consultadas (Dewald GW. y cols, 2.003; Haferlach C. y cols, 2.007), destacar que la deleción 17p se detectó en 4 de nuestros pacientes CD38- (en uno como única alteración y en 3 asociada a otras alteraciones) y en ningún paciente CD38+. Este hallazgo podría estar en relación con la existencia de un subgrupo de pacientes, recientemente identificado, con del17p (Tam CS. y cols, 2.009; Best OG. y cols, 2.009), caracterizado por presentar mutaciones en los genes de IgVH, negatividad para la expresión de ZAP70 y CD38, y una enfermedad estable durante periodos de tiempo prolongados.

Al agrupar las alteraciones citogenéticas en los 3 grupos de riesgo (favorable, intermedio y desfavorable) encontramos que las alteraciones del grupo favorable eran más habituales en los pacientes CD38- (83.19%), y las del grupo intermedio y desfavorable más frecuentes en los CD38+ (26.25% y 13.75%, respectivamente).

De acuerdo con lo ya publicado (Ibrahim S. y cols, 2.001; Chang C. y cols, 2.002; Krober A. y cols, 2.002; Chevalier P. y cols, 2.002, Ottaggio L. y cols, 2.003, Malavasi F. y cols, 2.011) en nuestra serie de pacientes, la expresión del antígeno CD38 se ha visto asociada a la adquisición de nuevas alteraciones citogenéticas (evolución clonal), lo que reflejaría una mayor inestabilidad del clon leucémico y un curso clínico menos indolente. Por este motivo, creemos que es aconsejable repetir los estudios biológicos y citogenéticos durante el curso evolutivo de la enfermedad, al menos siempre que se vayan a tomar decisiones terapéuticas.

6.2.5. Tratamiento.

El estudio realizado por Ghia en 2.003 objetivó que el 75% de pacientes que expresaban el antígeno CD38 precisaban al menos una línea de tratamiento frente a un 25.8% en el grupo de pacientes CD38-. En nuestra serie, durante el tiempo de seguimiento, también se observó una relación estadísticamente significativa entre la expresión de CD38 y la necesidad de requerir algún tipo de tratamiento a lo largo de la evolución de la enfermedad. El porcentaje de pacientes CD38+ que precisó tratamiento fue mayor (68%) que el de CD38- (37.8%). En cuanto a las líneas de tratamiento no se observaron diferencias entre ambos grupos, probablemente por la inclusión en la serie de pacientes de reciente diagnóstico. Como en otros estudios (Damle RN. y cols, 1.999; Del Poeta G. y cols, 2.001; Ibrahim S. y cols, 2.001; Jelinek DF. y cols, 2.001; Morabito F. y cols, 2.001; Durig J. y cols, 2.002) en los pacientes CD38+ el tiempo desde el diagnóstico al inicio del primer tratamiento fue menor que en los CD38-. No se observaron diferencias entre ambos grupos en cuanto a haber recibido o no tratamiento con fludarabina. Por el contrario al clasificar a los pacientes en 4 grupos de tratamiento (alquilantes, esquemas con fludarabina, poliquimioterapia tipo CHOP o COP y bendamustina/pentostatina), encontramos que los pacientes CD38- habían recibido agentes alquilantes en un porcentaje significativamente mayor que los CD38+, y que éstos a su vez recibieron más esquemas con fludarabina y poliquimioterapia, en definitiva tratamientos más agresivos en pacientes más jóvenes. No obstante, como hemos comentado antes hay que considerar estos resultados con cautela puesto que tanto los criterios de inicio de tratamiento como el tipo de quimioterapia administrada han sido muy heterogéneos, al menos en los pacientes diagnosticados en los primeros años del estudio y en los pacientes más añosos por las comorbilidades asociadas.

6.2.6. Supervivencia.

Al igual que en otros estudios (Damle RN. y cols, 1.999; Del Poeta G. y cols, 2.001; Ibrahim S. y cols, 2.001; Jelinek DF. y cols, 2.001; Morabito F. y cols, 2.001; Durig J. y cols, 2.002) en nuestra serie la supervivencia de los pacientes CD38- fue mayor que la de los CD38+ durante el periodo de seguimiento. No obstante existe un grupo reducido de pacientes CD38- que han fallecido: un 17.84% (29/164). De éstos, el 41.37% (12/29) murieron como consecuencia de la enfermedad. El resto lo hicieron por otras causas: 7 de ellos relacionadas con segundas neoplasias y 2 por sepsis.

Para concluir, y a la vista del impacto negativo que la expresión del antígeno CD38 imprime a las células de la LLC, se están desarrollando nuevos fármacos dirigidos a esta diana

terapéutica como el anticuerpo monoclonal daratumumab (De Weers M. y cols, 2.011). De los ensayos clínicos actualmente en marcha, podrán establecerse nuevas opciones terapéuticas aplicando estos anticuerpos bien solos o más probablemente en combinación.

6.3. LINFOCITOSIS MONOCLONAL B DE SIGNIFICADO INCIERTO EN NUESTRA POBLACION.

La incidencia y características de la LLC-B han cambiado significativamente en el último siglo. Gracias a los avances en la citometría de flujo actualmente se pueden detectar niveles muy bajos de células con fenotipo de LLC-B (Ghia P. y cols, 2.004; Rawstron AC. y cols 2.002; Rawstron AC. y cols 2.008; Nieto WG. y cols, 2.012). La LBM es una entidad diagnóstica definida recientemente como una población de células B anómala que no cumple criterios de malignidad. La mayoría de las LBM tienen un fenotipo idéntico a la LLC-B y comparten las mismas alteraciones cromosómicas. En la mayoría de los casos, la LBM se mantiene estable, progresando a LLC-B con necesidad de tratamiento solo en un 1 a 2% por año.

Reevaluamos nuestro grupo de pacientes diagnosticados previamente de LLC en estadios iniciales (0 de Rai/ A de Binet), reclasificándolos en función de los nuevos criterios diagnósticos de LLC/ LBM (Marti GE. y cols, 2.005; Hallek M. y cols, 2.008). En nuestra serie, el umbral de linfocitos totales en sangre periférica capaz de identificar a los pacientes que requerían tratamiento de aquellos con enfermedad estable fue de 10.000/ μL en contraposición a lo publicado por Shanafelt (Shanafelt TD. y cols, 2.009b), que situaba el punto de corte para predecir la supervivencia libre de tratamiento y la supervivencia global en 11.000 linfocitos B/ μL . Cabe destacar, que en otro artículo del mismo autor (Shanafelt TD. y cols, 2.009c), se establece en 10.000 linfocitos totales/ μL el valor que discrimina diferencias en cuanto al tiempo al primer tratamiento en pacientes en estadio 0 de RAI, como en nuestro caso. Diferentes también son los resultados del Grupo Italiano GIMEMA (Molica S. y cols, 2.011) que establece en 10.000 linfocitos B / μL el límite que distingue la LLC de otras condiciones premalignas como la LBM, al ser este nivel el mejor predictor del tiempo al primer tratamiento. Lo cierto es que aunque el cut-off de 5.000 linfocitos B/ μL es el actualmente establecido para el diagnóstico de LBM, su elección no se basó en datos objetivos de resultados clínicos, por lo que algunos investigadores cuestionan si este umbral es realmente predictivo de la evolución clínica en estadios iniciales de LBM/ LLC (Shanafelt TD. y cols, 2.009b; Shanafelt TD. y cols, 2.009c; Molica S. y cols, 2.011).

A diferencia del trabajo de la Clínica Mayo (Shanafelt TD. y cols, 2.009b), no incluimos en nuestro análisis el estado mutacional de las IgVH y evaluamos otras variables: la cifra de β2M , Hb

y plaquetas. No encontramos diferencias entre ambos grupos (< 10.000 linfocitos/ μL versus > 10.000 linfocitos/ μL) en cuanto a edad, siendo la mediana en ambos grupos mayor de 60 años, ni tampoco en cuanto al sexo, $\beta 2\text{M}$, Hb y plaquetas. Al igual que en el estudio de Shanafelt, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en cuanto a la expresión de ZAP70 y CD38. Tampoco en las alteraciones citogenéticas, en contra del estudio de Shanafelt, donde la mediana de células B al diagnóstico fue discretamente más alta entre los pacientes que presentan la deleción 11q. Estos resultados pueden ser debidos a que la determinación de CD38, ZAP70 y los estudios citogenéticos no han sido realizados en todos los pacientes incluidos en nuestro análisis. Sí encontramos diferencias significativas entre ambos grupos respecto al tiempo de duplicación linfocitaria durante el seguimiento, dato no aportado hasta ahora en las series revisadas. En cuanto a la necesidad de tratamiento sí que encontramos diferencias al igual que Shanafelt, no así en cuanto a la supervivencia global.

Cuando evaluamos los factores que eran predictores de la necesidad de tratamiento en el grupo de pacientes con < 10.000 linfocitos, actualmente reclasificados en su mayoría como LBM, las variables que resultaron significativas fueron: el recuento linfocitario, la citogenética desfavorable y la expresión de CD38. Sin embargo, en el análisis multivariante sólo la expresión de CD38 mantuvo significación estadística, igual que en uno de los trabajos de Shanafelt (Shanafelt TD. y cols, 2.009c). En otro de los estudios del mismo autor (Shanafelt TD. y cols, 2.009b), excluyendo del análisis el estado mutacional de IgVH, la expresión de ZAP70 fue el mejor predictor para la supervivencia libre de tratamiento y el FISH desfavorable (del11q, del17p) para la supervivencia global. En nuestra serie, la expresión de CD38 constituyó el único factor capaz de predecir la necesidad de tratamiento y por tanto la progresión a LLC. Estos resultados están en consonancia con los datos obtenidos por Oliveira y cols, que en una cohorte prospectiva de 135 pacientes en estadios iniciales de LLC (0-I de Rai) en los que se analizaban datos clínicos y biológicos (CD38, ZAP70 y alteraciones citogenéticas), y considerando sólo estos últimos, únicamente la expresión de CD38 y la deleción 17p se asociaban negativamente a supervivencia libre de progresión.

Por último, la tasa estimada de progresión a LLC que requiere tratamiento entre los sujetos con una cifra de linfocitos totales menor de $10.000/\mu\text{L}$ fue 1.4% por año, porcentaje similar al de las demás series estudiadas (Rawstron AC. y cols, 2.008; Hallek M. y cols, 2.011, Shanafelt TD. y cols, 2.009c).

6.4. NOMOGRAMA Y ESTRATIFICACION PRONOSTICA DE LOS PACIENTES.

Hasta ahora el manejo de la leucemia linfática crónica consistía en observar la evolución e iniciar el tratamiento cuando existían datos de progresión. Sin embargo, un 50% de los pacientes con estadios precoces presentan marcadores de mal pronóstico en el momento del debut y en ellos podría estar justificado el inicio del tratamiento de manera anticipada sobre todo si se trata de pacientes jóvenes, o lo que es lo mismo, el reconocimiento precoz de los estadios A agresivos y también de los estadios B (o más raramente C) indolentes conllevaría a una aproximación más racional a su tratamiento. No obstante, en el momento actual no existe evidencia de que el tratamiento de dichos pacientes en el momento del diagnóstico reporte beneficios clínicos (Shanafelt TD. y cols, 2.004; Chiorazzi N. y cols, 2.005; Foon KA. y Hallek MJ., 2.010).

Desde hace más de 30 años, los sistemas de estadificación clásicos, los estadios de Rai (Rai KR. y cols, 1.975) y Binet (Binet JL. y cols, 1.981) identifican grupos de riesgo basándose en las características clínicas y de laboratorio, y reflejan fundamentalmente el volumen de la masa tumoral. De forma global estos estadios se correlacionan con la supervivencia, aunque no identifican correctamente a un grupo de pacientes que a pesar de ser diagnosticados en estadios precoces, progresan rápidamente y tienen una supervivencia muy inferior a la esperada. Además el estadiaje clínico es insuficiente para predecir la necesidad de tratamiento para cada paciente individual, lo que hace necesaria la identificación de nuevas herramientas con valor pronóstico. En esta línea varios grupos (Matutes E. y cols, 1.994; Döhner H. y cols, 2.000; Ibrahim S. y cols, 2.001; Montserrat E. y cols, 2.001; Krober A. y cols, 2.002; Durig J. y cols, 2.003; Hamblin TJ. y cols, 2.003; Hallek M. y cols, 2.003; Kay NE. y cols, 2.007) han intentado desarrollar una estratificación de riesgo adaptando los nuevos factores pronóstico en LLC (inmunofenotípicos, citogenéticos y/o moleculares) que han ido apareciendo en los últimos años. Muchos de estos factores han mostrado ser potentes predictores de la supervivencia en LLC-B, pero no siempre es posible disponer de ellos por su alto coste económico y/o técnico, y por la dificultad añadida de su estandarización (Matthews C. y cols, 2.004; Letestu R. y cols, 2.010; Gachard N. y cols, 2.008; Smoley SA. y cols, 2.010). Por este motivo, recientemente se han propuesto escalas sencillas para poder estratificar a todos los pacientes con LLC-B (Wierda WG. y cols, 2.007; Shanafelt TD. y cols, 2.009a; Molica S. y cols, 2.010; Bulian P. y cols, 2.011). Entre ellas cabe destacar la descrita por Wierda WG. y cols del MDACC (Blood 2.007), que ha propuesto un nomograma y un índice pronóstico (IP) en pacientes diagnosticados de LLC-B no tratados. Con el nomograma se obtiene una puntuación con la cual se identifica la probabilidad de supervivencia a los 5 y a los 10 años y se estima la supervivencia media. El índice pronóstico está basado en 6 factores pronóstico

independientes (edad, sexo, estadiaje de Rai, número de regiones ganglionares afectadas, número de linfocitos y niveles de β 2-microglobulina) y a cada uno de ellos otorga una puntuación. En base a la puntuación obtenida se estratifica a los pacientes en 3 grupos de riesgo: bajo (1-3 puntos), intermedio (4-7 puntos) y alto (\geq 8 puntos). El tiempo de supervivencia para los 3 grupos fue diferente: no alcanzado para el bajo riesgo, 10.3 años para el riesgo intermedio y 5.4 años para el riesgo alto. A raíz de la publicación de este trabajo se han llevado a cabo múltiples estudios que han confirmado la validez y reproductibilidad de este nuevo índice pronóstico (Shanafelt TD. y cols, 2.009a; González-Rodríguez AP. y cols, 2.009, Molica S. y cols, 2.010), aunque con ciertas salvedades como veremos más adelante. Igualmente se está investigando la incorporación de nuevos factores pronóstico a este tipo de modelos, tales como el análisis citogenético por FISH, el estado mutacional de las cadenas pesadas de las Igs y la expresión del antígeno de superficie CD38 y la proteína ZAP-70 (Weinberg JB. y cols, 2.007; Letestu R. y cols, 2.010; Haferlach C. y cols, 2.010; Oliveira AC. y cols, 2.011; Bulian P. y cols 2.012).

En el presente trabajo, nos propusimos evaluar un grupo de 152 pacientes en seguimiento por LLC en nuestra institución durante un periodo de 14 años, evaluando los factores pronóstico clínicos y biológicos de importancia reconocida al diagnóstico, y su impacto en la supervivencia global. Además, desarrollamos un modelo de predicción de riesgo de modo similar al establecido por el grupo del MDACC, pero incorporando las nuevas estrategias diagnósticas disponibles en nuestro medio (citogenética, FISH, CD38 y ZAP70).

A diferencia del primer trabajo sobre el desarrollo de un nomograma en LLC-B, publicado por Wierda en el 2.007, al que ya hemos hecho referencia y que sirvió de punto de partida para esta investigación, en nuestra serie los factores asociados a la supervivencia que demostraron una mayor significación pronóstica de manera independiente fueron cinco: la edad, el estadio de Rai, la cifra de linfocitos, los hallazgos citogenéticos y la expresión de CD38/ZAP70. Con estos 5 factores desarrollamos un nomograma con la finalidad de predecir la supervivencia y establecimos un nuevo índice pronóstico (Tabla 58). La puntuación total (score IP) variaba de 0 a 9 puntos. Se dió 0 puntos cuando el paciente presentaba edad menor o igual de 65 años, cifra de linfocitos menor de 20.000, estadios 0 y I de Rai, citogenética convencional y/o FISH de bajo riesgo o CD38-/ZAP70-; 1 punto si edad mayor de 65 años, cifra de linfocitos entre 20.000 y 50.000, estadio II de Rai, citogenética convencional y/o FISH de riesgo intermedio o CD38+/ZAP70- o viceversa; y 2 puntos si cifra de linfocitos mayor de 50.000, estadios III y IV de Rai, citogenética convencional y/o FISH de alto riesgo o CD38+/ZAP70+. Nuestro índice pronóstico también discriminaba 3 grupos de riesgo: bajo (de 0 a 2 puntos), intermedio (de 3 a 4 puntos) y alto (de 5 a 9 puntos) (Tabla 59). La mediana de

supervivencia fue: no alcanzada para el grupo con índice pronóstico bajo, de 12.25 años para el grupo con índice pronóstico intermedio y de 3.5 años para el grupo con índice pronóstico alto.

Tabla 58. Índice pronóstico basado en la presencia de los 5 factores de riesgo en nuestra serie.

Variable	Puntuación		
	0	1	2
Edad	≤ 65 años	>65 años	
Linfocitos (μL)	<20.000	20.000-50.000	> 50.000
Estadio Rai	0-I	II	III-IV
CC y/o FISH	Bajo riesgo	Intermedio	Alto
CD38/ZAP70	CD38-/ZAP70-	CD38+/ZAP70- o viceversa	CD38+/ZAP70+

*CC: citogenética convencional.

Tabla 59. Supervivencia global y riesgo relativo de muerte en función de los 3 grupos de riesgo resultantes de nuestro IP.

Grupo de riesgo	Índice IP	Nº de pacientes	Mediana de supervivencia
Bajo	0-2	86	No alcanzada
Intermedio	3-4	48	12.25 años
Alto	5-9	18	3.5 años

En contraposición al índice propuesto por Wierda y cols, en nuestro modelo y en otros publicados (Shanafelt TD. y cols, 2.009a; Weinberg JB. y cols, 2.007; Letestu R. y cols, 2.010; Haferlach C. y cols, 2.010), el sexo no fue predictor de la supervivencia. Además, los 6 factores incluidos en el Índice Pronóstico del MDACC recibieron una ponderación diferencial en el índice acumulado de tal manera que la puntuación del índice estaba muy desviada hacia la edad. Debido a que la mediana de edad en el momento del diagnóstico de la LLC es de 65 a 70 años y aproximadamente un 60% de los pacientes son hombres, una gran proporción de pacientes con LLC se clasificaban en el grupo de riesgo intermedio únicamente en base a factores demográficos en

lugar de a las características específicas de la enfermedad. En nuestra serie, la edad si que mantuvo su valor predictivo, aunque a diferencia de la estratificación realizada por Wierda y cols, nuestro punto de corte fueron los 65 años, definiendo dos grupos en lugar de tres. Esta separación en 65 años se ajustaba más a la media de edad de nuestros enfermos y mostró diferencias significativas en la supervivencia global.

Por otro lado, la B2M al igual que la LDH se correlaciona con la carga tumoral y con el pronóstico en linfomas, sobre todo en aquellos con alta cinética tumoral y en el IP del MDACC la B2M tenía un peso elevado. Otros grupos también han incluido la B2M (Letestu R. y cols, 2.010; Bulian P. y cols, 2.011) y/o la LDH (Weinberg JB. y cols, 2.007) en sus respectivos índices pronóstico. Este último autor, incorpora la expresión de CD38 y los estadios de Rai modificados junto al nivel de LDH en la construcción de su IP, encontrando diferencias respecto al tiempo al primer tratamiento y en la supervivencia global. Sin embargo, en nuestra serie la B2M perdió relevancia pronóstica, lo cual no es de extrañar dada la naturaleza crónica de la enfermedad y la baja capacidad proliferativa de las células de la LLC sobre todo en los estadios iniciales de la misma.

Volviendo al nomograma del MDACC, otra de las variables con valor pronóstico independiente fue el recuento linfocitario estratificado en tres niveles (<20.000, 20-50.000 y >50.000). En nuestra serie de pacientes, comprobamos que conservaba la significación estadística y el recuento linfocitario fue incorporado al nomograma. Sin embargo, otros autores eliminaron esta variable de sus modelos al no confirmar su poder predictivo en sus respectivas cohortes (Shanafelt TD. y cols, 2.009a; Bulian P. y cols, 2.011).

El riesgo relativo de mortalidad para los estadios clínicos de Rai tuvo una relación marcadamente más poderosa para la supervivencia en nuestra serie. Mientras que el índice del MDACC clasificaba a menos de un tercio de nuestros pacientes recién diagnosticados como de bajo riesgo (24.3%), cuando aplicábamos nuestro IP aproximadamente dos tercios (55.9%) de los pacientes estaban dentro de esta categoría, en consonancia con lo que ocurría al emplear la estadificación clínica de Rai (77.6%), discrepancia también referida por otros grupos como los de la Clinica Mayo (Shanafelt TD. y cols, 2.009a) y el Grupo Italiano GIMEMA (Molica S. y cols, 2.010). De hecho, creemos que la estratificación de los grupos de riesgo del IP del MDACC incluía variables que podían resultar redundantes como los estadios de Rai dicotomizados (estadios 0-II vs estadios III-IV) y la presencia o no de adenopatías. En este sentido, hay que señalar la diferente integración de los sistemas de estadiaje clínicos por parte de los distintos investigadores, así mientras unos han considerado en la construcción de los IP los estadios de Binet (Bulian P. y cols

2.010) o bien los estadios de RAI modificados en grupos de riesgo (Rai KR., Han T., 1.990; Weinberg JB. y cols, 2.007) (bajo: estadio 0; intermedio: estadios I-II; alto: estadios III-IV); en nuestro caso integramos ambas clasificaciones siguiendo las recomendaciones del International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (Zwiebel JA. y Cheson BD.; 1.998).

Diversos estudios han demostrado la correlación de las anomalías cromosómicas determinadas por citogenética convencional y/o FISH con aspectos clínicos y evolutivos de la enfermedad (Juliussen G. y cols, 1.986; Döhner H. y cols, 2.000; Dewald GM. y cols, 2.003). Además, algunos investigadores han constatado que en más de un 25% de los pacientes aparecen alteraciones adicionales durante el curso de la enfermedad (evolución clonal), que están asociadas con una supervivencia más corta (Shanafelt TD., 2.006; Stilgenbauer S. y cols, 2.007; Delgado P. y cols 2.011). Inicialmente, el estudio se derivaba a centros de referencia y es a partir del año 2.004 cuando nuestro centro asumió la determinación de anomalías cromosómicas por FISH. Así confirmamos las alteraciones cromosómicas ya informadas por otros centros y detectamos otras nuevas en un pequeño porcentaje de pacientes. Solo 75 pacientes (45/86 en el grupo de bajo riesgo, 21/48 en el de riesgo intermedio y 9/18 en el de alto riesgo) disponían de estudios citogenéticos seriados a lo largo de la evolución de la enfermedad. De éstos, la evolución clonal se detectó en el 48% (36/75) de los pacientes (20/45 en el grupo de bajo riesgo, 12/21 en el de riesgo intermedio y 4/9 en el de alto riesgo). No observamos correlación de ésta con el IP, posiblemente porque al no ser conscientes de la importancia de llevar a cabo su determinación más allá del momento del diagnóstico, carecíamos de estos datos en el grupo de pacientes más antiguos de nuestra serie. En 15 de los 20 pacientes con una puntuación-score de 0 se realizaron estudios citogenéticos seriados detectándose evolución clonal en un 30% de los pacientes (6/15) presentando todos ellos como nueva alteración citogenética la delección 13q, en 5 de ellos como única alteración y en 1 asociada a la delección 11q. El paciente que adquirió esta última anomalía fue sometido a trasplante alogénico de intensidad reducida, encontrándose vivo en la fecha de cierre del estudio.

El trabajo de Döhner y cols, estableció inequívocamente el valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas detectadas por FISH en el mismo momento del diagnóstico de la LLC. Sin embargo, las versiones más extendidas de esta técnica solo pueden dar información sobre un limitado número de alteraciones. En contraposición, la citogenética convencional, especialmente desde que se emplean mitógenos como DSP30, ha permitido incrementar el porcentaje de alteraciones cromosómicas que se asocian a esta entidad (Dicker F. y cols, 2.006; Haferlach C. y cols, 2.007). En nuestro modelo, la estratificación de los resultados citogenéticos en los tres grupos de riesgo se asoció significativamente con la supervivencia de los pacientes y mantuvo su poder

estadístico en el análisis multivariante. Por lo tanto, la complejidad citogenética, evaluada por el análisis con FISH y por el número de alteraciones cromosómicas en el cariotipo tuvo un impacto negativo sobre la supervivencia en nuestra serie, de acuerdo con lo publicado por Haferlach C. y cols en 2.010. Por su parte, este grupo realizó una propuesta de IP para la estimación de la supervivencia global basado en 6 parámetros (edad, recuento leucocitario, estado mutacional de IgVH, delp53, traslocaciones de IgH|@ en 14q32 y número de alteraciones cariotípicas); y un segundo IP para el tiempo hasta el primer tratamiento basado en 4 (estado mutacional de IgVH, del11q, traslocaciones de IgH|@ en 14q32 y número de alteraciones cariotípicas). Aunque sus resultados mostraban diferencias en la supervivencia global y en el tiempo hasta el primer tratamiento entre los distintos grupos de riesgo, a nuestro entender los ítems que utilizan para el IP no son fácilmente accesibles para todos los centros.

La expresión de CD38/ZAP70 también tiene implicación pronóstica demostrada en múltiples trabajos (Damle RN. y cols, 2.000; Del Poeta y cols, 2.001; Ibrahim S. y cols, 2.001; Hamblin TJ. y cols, 2.002; Krober A. y cols, 2.002; Ottaggio L. y cols, 2.003; Durig J. y cols, 2.003; Crespo M. y cols, 2.003; Rassenti LZ. y cols, 2.004), ya que aportan información intrínseca de las células tumorales desde el momento del diagnóstico de la enfermedad. En nuestra serie, la expresión de CD38 se relacionó significativamente con la supervivencia global, corroborando su valor predictivo descrito por otros investigadores (Ibrahim S. y cols, 2.001; Ottaggio L. y cols, 2.003; Hamblin TJ. y cols, 2.002; Krober A. y cols, 2.002; Oliveira AC. y cols, 2.010, Malavasi F. y cols, 2.011). Por el contrario, en el presente estudio ZAP70 no se correlacionó con la supervivencia al ser analizado de forma aislada, al igual que en otros trabajos destacados (Weinberg JB. y cols, 2.007; Letestu R. y cols, 2.010; Oliveira AC. y cols 2.010; Bulian P. y cols, 2.012). Sin embargo, y en consonancia con lo descrito por Hus y colaboradores en 2.008, el análisis de la asociación de ambos antígenos CD38/ZAP70 sí que se tradujo en una significativa correlación con la supervivencia. Destacar que la determinación de ZAP70 en nuestro centro comenzó a realizarse en el año 2.004, por lo tanto no en todos los pacientes su determinación fue llevada a cabo al diagnóstico. No obstante, decidimos incluirla en nuestro modelo dado que diferentes trabajos avalan que su expresión, a diferencia de lo que ocurre con la de CD38, permanece constante a lo largo del tiempo (Crespo M. y cols, 2.003; Durig J. y cols, 2.003; Rassenti LZ. y cols, 2.004; Orchard JA. y cols, 2.004).

Al aplicar el IP del MDACC en nuestra serie, hemos confirmado las diferencias señaladas por otros autores (Shanafelt TD. y cols, 2.009a; González-Rodríguez AP. y cols, 2.009, Molica S. y cols, 2.010) respecto al posible sesgo de selección de los pacientes de dicha institución, los cuales

eran más jóvenes, mayoritariamente pertenecían al grupo de riesgo intermedio y recibían tratamiento de forma más precoz. Nuestro grupo de pacientes, pertenece a una amplia area sanitaria, y son remitidos a la consulta desde el mismo momento en el que se detecta una linfocitosis aislada en sangre periférica (motivo de consulta más frecuente). Por lo tanto la mayoría de nuestros enfermos no solo tienen una mediana de edad más avanzada sino que se encuentran principalmente en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, nuestro índice pronóstico correlacionó mejor que el índice del MDACC frente a la escala de riesgo de los estadios de Rai, presentando un índice de concordancia mayor.

Al igual que en otros trabajos (Wierda G. y cols, 2.007; Shanafelt T. y cols, 2.009a; Molica S. y cols, 2.010; Letestu R. y cols, 2.010; Bulian P. y cols, 2.010), en nuestra serie la supervivencia estimada de los pacientes en cada uno de los 3 grupos de riesgo generados según nuestro IP fue claramente diferente: 89.5% en el grupo de bajo riesgo, 81.3% en el grupo de riesgo intermedio y 38.9% en el grupo de alto riesgo. Destacar que no ha fallecido ninguno de los 20 pacientes en el grupo de bajo riesgo que tenían una puntuación-score de 0 y que de los 66 pacientes restantes del mismo grupo con puntuación-score 1 ó 2 han fallecido 9, de los que sólo 2 murieron a causa de la LLC. Cuando analizamos los 18 pacientes de nuestro grupo de alto riesgo, si hubiéramos aplicado la escala del grupo del MDACC 11 de ellos se habrían clasificado dentro del grupo de riesgo intermedio; sin embargo 7 de ellos fallecieron. De estos 7 fallecidos, 2 murieron a causa de la LLC, 1 por segunda neoplasia, 2 de causas no relacionadas con la LLC y en los 2 restantes desconocemos la causa. Del total de pacientes fallecidos en los 3 grupos pronósticos, el 46.2% estaban en progresión, reforzando la tesis que la mayoría de pacientes con LLC muere a consecuencia de la propia enfermedad. La principal causa de muerte fue la infecciosa (sepsis – 42.3%- y neumonías – 11.5%-), seguida de las segundas neoplasias tal y como se ha descrito ampliamente en otras series (Callea V. y cols, 2.006; Ravandi F. y O'Brien S, 2.006; Thurmes P. y cols, 2.008; Tam CS. y cols, 2.008; Gribben J., 2.010; Morton LM. y cols, 2.010).

Aunque el objetivo inicial al desarrollar nuestro IP era valorar la supervivencia global, adicionalmente analizamos si había diferencias respecto a la necesidad de recibir tratamiento y al tiempo al primer tratamiento como han realizado otros autores (Shanafelt T. y cols, 2.009a; Molica S. y cols, 2.010; Bulian P. y cols, 2.010; Wierda W. y cols, 2.011). Nosotros también observamos una relación estadísticamente significativa entre los tres grupos de riesgo pronóstico según nuestro IP y la necesidad de requerir algún tipo de tratamiento, de forma que el 100% de los pacientes del grupo de alto riesgo necesitaron quimioterapia frente al 60.4% del grupo de riesgo intermedio y al 34.8% del grupo de bajo riesgo. Además, la mediana de tiempo estimada hasta el inicio del primer

tratamiento también fue diferente para los distintos grupos pronóstico según nuestro IP: 35 meses para el grupo de bajo riesgo, 9 meses para el intermedio y 1 mes para el grupo de alto riesgo.

En la actualidad, las variables incluidas en nuestro modelo pueden ser realizadas en la mayoría de los centros hospitalarios de nivel tres del estado (o eventualmente en laboratorios concertados). En nuestro trabajo existen debilidades que deberían ser abordadas antes de su posible uso por otros centros; el primer inconveniente que podemos encontrar es referente al análisis inmunofenotípico de CD38 y, particularmente, de ZAP70 ya que se ha debatido ampliamente la heterogeneidad de datos cuando se comparan resultados entre distintos laboratorios originados en los reactivos y los equipos. En segundo lugar, los niveles de expresión del antígeno CD38 pueden cambiar a lo largo de la evolución de la enfermedad y también en relación a tratamientos u otros procesos intercurrentes (Ibrahim S. y cols, 2.001; Hamblin TJ. y cols, 2.002; Krober A. y cols, 2.002; Chan C. y cols, 2.002); de hecho estos cambios mas que una debilidad podrían considerarse una fortaleza ya que podrían ser un reflejo de cambio en la biología de la enfermedad (Malavasi F. y cols, 2.011) y quizás entrar a formar parte de un futuro algoritmo dinámico de la enfermedad. En tercer lugar, independientemente de los problemas inherentes a la técnica, los puntos de corte establecidos por los diversos centros no son necesariamente iguales; aunque este hecho ha sido, y es, motivo de numerosos *workshops*, dista de estar resuelto. Por último, existen grupos que están investigando la incorporación del estado mutacional de las cadenas pesadas de las Igs al índice pronóstico; esta técnica, a nuestro modo de ver, es compleja y costosa, además de estar disponible en una minoría de centros (Letestu R. y cols, 2.010; Haferlach C. y cols, 2.010; Bulian P. y cols 2.012) por lo que su generalización se nos antoja complicada.

Las herramientas que permiten establecer una mejor aproximación al pronóstico individual de cada paciente, permitirán una mejor planificación del seguimiento y control, y llegado el momento de las opciones terapéuticas más adecuadas y adaptadas al riesgo específico. Además serán útiles para ayudar a los pacientes a planificar sus vidas.

A la luz de los resultados expuestos, creemos que nuestro Índice Pronóstico podría ser una herramienta que ayudara a predecir el riesgo en pacientes sin tratamiento previo de LLC a través de la adición de parámetros pronóstico citogenéticos y biológicos, con el fin de incrementar aún más la precisión pronóstica y así mejorar su atención clínica.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES.

En relación con los objetivos propuestos en el siguiente trabajo de investigación, de nuestros resultados pueden deducirse las siguientes conclusiones generales:

1.- En relación a la evaluación completa de todos los datos de los pacientes:

- En nuestro estudio se confirma que el curso clínico de los pacientes diagnosticados de esta enfermedad es heterogéneo con una supervivencia muy variable.

2.- Con respecto a la relación entre todos los datos clínico-biológicos y la evolución clínica de la enfermedad en nuestros pacientes:

- La edad, la presencia de adenopatías, la hepatoesplenomegalia, el estadio clínico según la clasificación Rai y Binet, la cifra de β 2M y LDH, el TCD, el TDL, el patrón de infiltración ósea y el score inmunofenotípico se correlacionan con la supervivencia.
- En nuestro trabajo la expresión del antígeno CD38 es un factor pronóstico independiente que se relaciona con supervivencias más cortas.
- El estudio citogenético define claramente 3 grupos de riesgo pronóstico con implicación en la supervivencia global. Igualmente, la evolución clonal se correlaciona negativamente con la supervivencia.
- La necesidad de recibir tratamiento se correlaciona con factores de mal pronóstico: estadio clínico avanzado, β 2-microglobulina elevada, patrón de infiltración ósea no nodular, score inmunofenotípico bajo, CD38+ y anomalías citogenéticas desfavorables.

3.- Al Analizar la LBM de nuestra serie una vez reclasificados los antiguos estadios 0 de RAI según los nuevos criterios del NCI-WG/IWCLL (Hallek M. y cols, 2.008), establecer el umbral linfocitario en nuestra población capaz de predecir el riesgo de transformación de LBM en una enfermedad activa y evaluar la relación de factores pronósticos clínicos y biológicos al diagnóstico de la LBM con su evolución:

- Nuestros resultados muestran que un conteo linfocitario de 10.000/ μ L es el umbral que predice el riesgo de transformación de LBM/LLC en una enfermedad activa que requiere tratamiento.
- Adicionalmente la expresión de CD38 también es un factor predictivo de esta transformación desde el mismo momento del diagnóstico.

4.- Al analizar los factores pronóstico de supervivencia y construir un nomograma e índice pronóstico a raíz del estudio de las características clínico-biológicas de estos pacientes diagnosticados de LLC-B en nuestro medio y analizar la concordancia del nomograma e IP de Wierda et al con la supervivencia de nuestra serie:

- Los factores asociados a la supervivencia que demostraron una mayor significación pronóstica independiente fueron: la edad, el estadio clínico de Rai, la cifra de linfocitos, la citogenética convencional y/o FISH y la expresión de CD38/ZAP70. Teniendo en cuenta estas cinco variables con valor pronóstico independiente hemos diseñado un índice pronóstico definiendo 3 grupos de riesgo en nuestra población: bajo, intermedio y alto, con diferente supervivencia. Esta estratificación del riesgo en función de las características propias de cada paciente puede tener implicaciones en el manejo clínico de los mismos desde el diagnóstico de la LLC.
- Nuestro índice pronóstico correlaciona mejor que el índice del MDACC frente a la escala de riesgo de los estadios de Rai, presentando una concordancia mayor y ajustándose más a las características de una población general como la nuestra.

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

- Abrisqueta P, Pereira A, Rozman C, Aymerich M, Gine E, Moreno C, Muntanola A, Rozman M, Villamor N, Hodgson K, et al. Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980-2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood*, September 3, 2009; 114(10): 2044 - 2050.
- Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by Rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 709-723.
- Auer RL, Riaz S, Cotter FE. The 13q and 11q B-cell chronic lymphocytic leukaemia-associated regions derive from a common ancestral region in the zebrafish. *Br J Haematol*. 2007 Jun; 137 (5): 443-53.
- Barcellini W, Capalbo S, Agostinelli RM, et al. Relationship between autoimmune phenomena and disease stage and therapy in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2006; 91: 1689-1692.
- Berrigan MA, Eichhorst BF, Busch R, et al. Prospective evaluation of prognostic parameters in early stage chronic lymphocytic leukemia (CLL): results of the CLL1-protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood*. 2007; 110 (625).
- Best OG, Gardiner AC, Davis ZA, et al. A subset of Binet stage A CLL patients with TP53 abnormalities and mutated IGHV genes have stable disease. *Leukemia*, 2009; 23(1): 212-214.
- Binet JL, Lepoprier M, Dighiero G, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukaemia: prognosis significance. *Cancer*. 1977; 40: 855-864.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48(1): 198-206.
- Bosch F, Ferrer A, López-Guillermo A, Giné E, Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Cobo F, Perales M, Esteve J, Altés A, Besalduch J, Ribera JM, Montserrat E; GELCAB (Grup per l'Estudi dels Limfomes a Catalunya i Balears). Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2002 Dec; 119 (4): 976-84.

- Bosch F, Abrisqueta P, Villamor N, Terol MJ, González-Barca E, Ferrer C, González Diaz M, Abella E, Delgado J, Carbonell F, García Marco JA, Escoda L, Ferrer S, Monzó E, González Y, Estany C, Jarque I, Salamero O, Muntañola A, Montserrat E. Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone: a new, highly active chemoimmunotherapy regimen for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 20; 27(27):4578-84.
- Bulian P, Tarnani M, Rossi D, et al. Multicentre validation of a prognostic index for overall survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol Oncol* 2011, 29(2): 91-99.
- Bulian P, Rossi D, Forconi F et al. IGHV gene mutational status and 17p deletion are independent molecular predictors in a comprehensive clinical-biological prognostic model for overall survival prediction in chronic lymphocytic leukemia. *J Transl Med* 2012; 10: 18.
- Byrd JC, Peterson BL, Morrison VA, et al. Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with Rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: result from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712). *Blood*. 2003; 103: 6-14.
- Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B –cell chronic lymphocytic leukaemia: a bird of a different feather. *J.Clinic Oncology* 1999; 17: 399-408.
- Callea V, Brugiattelli M, Stelitano C, et al. Incidence of second neoplasia in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia treated with chlorambucil maintenance chemotherapy. *Leuk Lymphoma*. 2006; 47: 2314–2320.
- Catovsky D, Fooks J, Richard S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol*. 1989; 72: 141-149.
- Chang C, Cleveland RP. Conversion of CD38 and/ or myeloid-associated marker expression status during the course of B-CLL: association with a change to an aggressive clinical course. *Blood*, Vol 100, N° 3 (August 1), 2002: 1106.
- Chen H, Treweek AT, West DC. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, Vol 96, 2000: 3181-3187.
- Chen L, Widhop G, Huynh L, et al. Expresión of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leucemia. *Blood*, Vol 100, 2002: 4609-4614.

- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-Sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996; 87: 4990-4997.
- Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, Robillard N, Ifrah N, Mahé B, Hamidou M, Maisonneuve H, Moreau P, Jardel H, Harousseau JL, Bataille R, Garand R. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2002 Jan; 116 (1): 142-50.
- Chiorazzi M.D., Kanti R., Rai M.B., B.S. and Manlio Ferrarini M.D. Mechanisms of disease Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2005, 352; 8: 804-815.
- Crespo M, Bosh F, Villamor N, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 Expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region-mutations in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2003; 348: 1764-75.
- Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De Angeli C, Veronese A, Cavazzini F, Bardi A, Roberti MG, Tammiso E, Agostini P, Ciccone M, Della Porta M, Tieghi A, Cavazzini L, Negrini M, Castoldi G. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*. 2004 Mar; 18 (3): 476-83.
- Dagklis A, Fazi C, Scarfo L, Apollonio B, Ghia P. Monoclonal B lymphocytosis in the general population. *Leukemia Lymphoma*. 2009. Mar; 50 (3): 490-2.
- Damle RN, Tarun Wasil, Franco Fais, Fabio Ghiotto, Angelo Valetto, Steven L.Allen, Aby Buchbinder, Daniel Budman, Klaus Dittmar, Jonathan Kowitz, Stuart M. Lichtman, Philip Schulman, Vincent P. Vinciguerra, Kanti R. Rai, Manlio Ferrarini and Nicholas Chiorazzi. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Vol 94, N° 6 (September 15), 1999: 1840-1847.
- Damle RN, Tarun Wasil, Steven L.Allen, Philip Schulman, Kanti R. Rai and Nicholas Chiorazzi. Updated data on V gene mutation status and CD38 expression in B-CLL. *Blood*, Vol 95, N° 7 (April 1), 2000: 2456.
- Damle RN, Ghiotto F, Balteo A, Albesiano E, Fais, F et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*, 2002; 99: 4087-4093.
- Damle RN, Temburni S, Calissano C, Yancopoulos S, Banapour T, Sison C, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*. 2007 Nov 1; 110(9):3352-9.

- D'Arena et al. CD38 expression does not change in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Vol 100, N° 8 (October 15), 2002: 3052.
- Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, Bonillo L, Horenstein A, Tamagnone L, Bounsell L and Malavasi F. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood*, 15 April 2005, 105: 3042-3050.
- Dearden C, Wade R, Else M, Richards S, Milligan D, Hamblin and Catovsky D, for the UK National Cancer Research Institute (NCRI) Haematological Oncology Clinical Studies Group and NCRI CLL Working Group. The prognostic significance of a positive direct antiglobin test in chronic lymphocytic leukemia: a beneficial effect of the combination of fludarabine and cyclophosphamide on the incidence of haemolytic anemia. *Blood*, 15 February 2008, volume 111, number 4.
- Decker T, Oelsner M, Kreitman RJ, Salvatore G, Wang QC, Pastan I, Peschel C, Licht T. Induction of caspase-dependent programmed cell death in B-cell chronic lymphocytic leukemia by anti-CD22 immunotoxins. *Blood*. 2004 Apr 1; 103 (7):2 718-26.
- Delgado J, Matutes E, Morilla AM, Owuvu-Ankomah KA, Rafia-Mohammed F, del Giudice I, Catovsky D. Diagnostic significance of CD20 and FMC7 expression in B-cell disorders. *Am J Clin Pathol*. 2003; 120 (5): 745-9.
- Delgado J, Pillai S, Phillips N, Brunet S, Pratt G, Briones J et al. Does reduced-intensity allogeneic transplantation confer a survival advantage to patients with poor prognostic chronic lymphocytic leukaemia? A case control retrospective analysis. *Ann Oncol* 2009; 20: 2007-2012.
- Delgado J, Espinet B, Oliveira AC, Abrisqueta P, de la Serna J, Collado R, Loscertales J, Lopez M, Hernandez-Rivas JA, Ferra C, Ramirez A, Roncero JM, Lopez C, Aventin A, Puiggros A, Abella E, Carbonell F, Costa D, Carrio A, Gonzalez M; on behalf of the Grupo Español de Leucemia Linfatica Cronica (GELLC) y Grupo Español de Citogenetica Hematologica (GECGH). Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *Br J Haematol*. 2012 Jan 9.
- Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, et al. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer* 2005; 104: 2124-2132.
- Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, Tamburini A, Suppo G, Battaglia A, Del Principe MI, Del Moro B, Masi M, Amadori S. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 Nov 1; 98 (9): 2633-9.

- Demidem A, Lam T, Alas S, et al. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B-cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother Radiopharm.* 1997; 12: 177-186.
- Dewald GW, Brockman SR, Pasternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase FISH: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal Haematology*, 2003; 121: 287-295.
- De Weers M, Tai YT, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DC, Oomen LA, Peipp M, Valerius T, Slootstra JW, Mutis T, Bleeker WK, Anderson KC, Lokhorst HM, van de Winkel JG, Parren PW. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol.* 2011 Feb 1; 186(3):1840-8.
- Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, et al. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*, 2006; 108(9): 3152-3160.
- Dillman RO, Mick R, McIntyre OR. Pentostatin in chronic lymphocytic leukemia: a phase II trial of cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol.* 1989; 7: 433.
- Ding W, Nowakowski GS, Knox TR, et al. Bidirectional activation between mesenchymal stem cells and CLL-B cells: implication for CLL disease progression. *Br J Haematol.* 2009; 147 (4): 471-483.
- Di Raimondo F, Giustolisi R, Lerner S, et al. Retrospective study of the prognostic role of serum thymidine kinase level in CLL in patient with active disease treated with fludarabine. *Ann Oncology.* 2001; 12: 621-625.
- Döhner H, Fischer K, Bentz M, et al. P53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*, 1995; 85: 1580-1589.
- Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*, 1997; 89: 2516-2522.
- Döhner H, Stephan Stilgenbauer, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M. Genomic aberrations and survival in Chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343: 1910-6.

- Domingo-Domenech E, Domingo-Claros A, González-Barca E et al. CD38 expression in B-cell: chronic lymphocytic leukaemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. *Haematologica* 2002; 87: 1021-1027.
- Dreger P, Corradini P, Kimby E et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 2007; 21: 12-17.
- Dreger P, Döhner H, Ritgen M, et al. Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: long term clinical and MRD results of the German CLL Study Group CLL3X trial. *Blood*, 2010; 116 (14): 2438-2447.
- Durig J, Naschar M, Schmucker U, et al. CD38 expression is an important prognosis marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, 2002; 16: 30-35.
- Durig J, Nuckel, H, Cremer M, Fuhrer A, Hlafmeyer K, Fandrey J, Moroy T, Klein-Hitpass L, Duhrsen U. ZAP-70 expression is a prognostic factor in Chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2003.
- Eichhorst B., Dreyling M., Robak T., Montserrat E. y Hallek M. On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 22 (Supplement 6): vi50-vi54, 2011.
- Elter T, Borchmann P, Schulz H, Reiser M, Trelle S, Schnell R, Jensen M, Staib P, Schinköthe T, Stützer H, Rech J, Gramatzki M, Aulitzky W, Hasan I, Josting A, Hallek M, Engert A. Fludarabine in combination with alemtuzumab is effective and feasible in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II trial. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 1; 23 (28): 7024-31.
- Fais F, Guiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukaemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin Invest*. 1998; 102: 1515-1525.
- Fegan C, Robinson H, Thompson P, et al. Karyotypic evolution in CLL: Identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia* 9: 2003-2008, 1995.
- Finn WG, Kay NE, Kroft SH, et al. Secondary abnormalities of chromosome 6q in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: A sequential study of karyotypic instability in 51 patients. *Am J Hematol* 59: 223-229, 1998.
- Flinn IW, Byrd JC, Morrison C, et al. Fludarabine and cyclophosphamide with filgrastim support in patient with previously untreated indolent lymphoid malignancies. *Blood*. 2000; 96: 71-75.

- Ferrarini M. and Chiorazzi N. Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Hematology*, Vol 41, n°3 (July), 2004: 207-223.
- Foon KA and Hallek MJ. Changing paradigms in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2010; 24:500-511.
- Gachard N, Salviat A, Boutet C, Arnoulet C, Durrieu F, Lenormand B, Leprere S, Olschwang S, Jatdin F, Lafage-Pochitalof M, Penther D, Sainty D, Reminieras L, Feuillard J and Bene MC for the GEIL. Multicenter study of ZAP70 expression in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia using an optimized flow cytometry method. *Haematologica*. 2008; 93(2): 215-223.
- Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strota G, Scielzo C, Caligaris-Cappio F. 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.
- Ghia P, Prato G, Scielzo C, Stella S, Geuna M, Guida G, Caligaris-Cappio F. Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood*. 2004 Mar 15; 103(6): 2337-42.
- Geisler C, Ralfkiaer E, Hansen MM, et al. The bone marrow histological pattern has independent prognostic value in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*. 1986; 62 (1): 47-54. Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strota G, Scielzo C, Caligaris-Cappio F. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*, Vol 101, N° 4 (February 15), 2003: 1262-1269.
- González-Rodríguez AP, González García E, Fernández Álvarez C, González Huerta AJ, González Rodríguez S. Estudio epidemiológico y comparación de los índices pronósticos del MD Anderson Cancer Center y el índice del Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto en pacientes con leucemia linfática crónica de células B. *Med Clin*, 2009; 133 (5): 161-166.
- Gonzalez D, Martinez P, Wade R, 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 Jun 1; 29 (16): 2223-9.
- Gribben J. How I treat CLL up front. *Blood*, Vol 115, N°2, January 2010: 187-197.
- Guarini A, Gaidano G, Romana Mauro, F, Capello D, De Propriis MS, Manzini M, Orsini E, Gentile M, Breccia M, Cuneo A, Castoldi G, Foa R. Chronic lymphocytic leukaemia

patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features. *Blood*, Vol 102, N° 3 (August 1), 2003: 1035-1041.

- Hainsworth JD, Litchy E, Barton JH, et al. Single agent Rituximab as first line and maintenance treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 1746-1751.
- 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, IgVH status and immunophenotyping. *Leukemia*, 2007; 21 (12): 2442-2451.
- Haferlach C, Dicker F, Weiss T, et al. Toward a comprehensive Prognostic Scoring System in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010; 49: 851-859.
- Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al. Elevated serum thymidine kinase 1 level identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 93 (5): 1732-1737.
- Hallek M. Risk adapted management of chronic lymphocytic leukemia: update on the cooperative trials of the German Chronic Lymphocytic Leukemia StudyGroup. *Haematologica* 2003; 88 Suppl 17:26-30.
- 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 CLL updating the NCI-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446-54.
- Hallek M. State-of-the-art treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009: 440-9.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Vol 94, N° 6 (September 15), 1999: 1848-1854.
- Hamblin TJ, Orchard JA, Gardiner A, Oscier DG, Davis Z, Stevenson FK. Immunoglobulin V genes and CD38 expression in LLC. *Blood*, Vol 95, N° 7 (April 1), 2000: 2455.
- Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*, Vol 99, N° 3 (February 1), 2002: 1023-1029.
- Hansen MM, Anderson E, Bigrgens H, et al. CHOP versus chlorambucil + prednisolone in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1991; 5: 97.

- Hernández JA, Rodríguez AE, González M, et al. A high number of losses in 13q14 chromosome is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B chronic lymphoid leukemia. *Haematologica*, 2009; 94: 364-371.
- Hernández JA, González M, Hernández JM. Chronic lymphocytic leukemia. *Med Clin*. 2010; 135 (4): 172-8.
- Heintel D, Kroemer E, Kienle D, Schwarzinger I, Gleiss A, Schwarzmeier J, Marculescu R, Le T, Mannhalter C, Gaiger A, Stilgenbauer S, Dohner H, Fonatsch C, Jager U; German CLL Study Group. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2004 April; 18 (4): 756-62.
- Herling M, Patel KA, Khalili J, Schlette E, Kobayashi R, Medeiros LJ, Jones D. TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia*. 2006 Feb; 20 (2): 280-5.
- Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, Jaksic B, Dmoszynska A, Wu J, Sirard C, Mayer J. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2007 Dec 10; 25(35): 5616-23.
- Hus I, Bojarska-Junak A, Dmoszynska A, et al. ZAP-70 and CD38 expression are independent prognostic factors in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and combined analysis improves their predictive value. *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46: 147-152.
- Iasonos A, Schrag D, Raj GV, Panageas KS. How to build and interpret a nomogram for cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 10; 26 (8): 1364-70.
- Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognosis factor in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood*. 2001; 98: 181-186.
- Itala M, Geisler CH, Kimby E, et al. Standard dose anti-CD20 antibody Rituximab has efficacy in chronic lymphocytic leukemia: results from a Nordic multicentre study. *Eur J Haemat*. 2002; 69: 129-134.
- Jelinek DF, Tschumper RC, Séller SM, et al. Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br Journal Haematology*. 2001; 115: 854-861.
- Juliusson G. Immunologic and cytogenetic studies improve prognosis prediction in chronic B-lymphocytic leukemia. A multivariate analysis of 24 variables. *Cancer*, 1986; 58: 688-653.

- Kallander CF, Simonson B, Hagberg H, Gronowitz JS. Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1984; 54: 2450-2455.
- Kay NE, Bone ND, Tschumper RC. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro and anti-angiogenic molecules. *Leukemia*. 2002; 16: 911-919.
- Kay NE, Shanafelt TD. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2007 Feb; 2(1): 49-55.
- Keating MJ, Lerner S, Kantarjian H, Freireich EJ, O'Brien S. The serum β 2-microglobulin (β 2-m) level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 1995; 86 (suppl 1): 606a.
- Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, et al. Long term follow-up of patient with CLL receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*. 1998; 92: 65-71.
- Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 1999 Oct; 26 (5 Suppl 14):107-14.
- Keating MJ, Mashouri T, O'Brien S, et al. A high proportion of true complete remission can be obtained with a fludarabine, cyclophosphamide rituximab combination (FCR) in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003; 22: 569.
- Kennedy B, Rawstron A, Carter C, et al. Campath-1H and fludarabine in combination are highly active in refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 99: 2245-2247.
- Kharfan-Dabaja MA, Pidala J, Kumar A, Terasawa T, Djulbegovic B. Comparing efficacy of reduced-toxicity allogeneic hematopoietic cell transplantation with conventional chemo-(immuno) therapy in patients with relapsed or refractory CLL: a Markov decision analysis. *Bone Marrow Transplant*, 2012: 1-7.
- Khouri I, Munsell M, Yajzi S, et al. Comparable survival for nonablative and ablative allogeneic transplantation for early intervention. *Blood* 2000; 96: 205a.
- Khouri IF, Keating MJ, Saliba RM, et al. Long-term follow-up of patient with CLL treated with allogeneic hematopoietic transplantation. *Cytotherapy* 2002; 4 (3): 217-221.
- Kini AR, Kay NE, Peterson LC. Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2000; 14: 1414-1418.
- Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 97: 1005-1012.
- Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, Liberati A, Loscertales J, Herbrecht R, Juliusson G, Postner G, Gercheva L, Goranov S, Becker M, Fricke HJ, Huguet F, Del Giudice I, Klein P, Tremmel L, Merkle K, Montillo M. Phase III randomized study of bendamustine

compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 10; 27 (26):4378-84.

- Kotkowska A, Wawrzyniak E, Blonski JZ, Robak T, Korycka-Wolowicz A. Chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia detected by conventional cytogenetics with DSP30 as a single agent: comparison with FISH. *Leukemia Research*. 2011 Aug; 35(8): 1032-8.
- Krober A, Seiler T, Benner Axel, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Vol 100, N° 4 (August 15), 2002: 1410-1416.
- Krober A, Bloehdorn J, Hafner S, Bühler A, Seiler T, Kienle D, Winkler D, Bangerter M, Schlenk R, Benner A, Lichter P, Döhner H and Stilgenbauer. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukaemia. *Journal of clinical oncology*. 2006. Volumen 24: 969-975.
- Lee YK, Bone NC, Strega AK, Shanafelt TD, Jelinek DF, Kay NE. VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Vol 104, N° 3 (August 1), 2004: 788-794.
- Letestu R, Rawstron A, Ghia P, Villamor N, Leuven NB, Boettcher S, et al. Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: a multicentric international harmonization process. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70: 309-14.
- Letestu R, Levy V, Eclache V, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood*, 2010; 116 (22): 4588-4590.
- Levy V, Nataf J, Zompi S, et al. Prognostic significance of serum thymidine kinase levels and P27KIP1 expression in CLL. *Blood*. 1999; 94: 312^a.
- Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression and IgVH mutation in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood*. 2002; 100: 1404-1409.
- Magnac C, Porcher R, Davi F, Nataf J, Payelle-Brogard B, Tang RP, Oppezio P, Levy V, Dighiero G, Ajchenbaum-Cymbalista F. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig V mutational status in B-CLL. *Leukemia* 2003 Jan; 17 (1): 133-137.
- Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, Ferrarini M, Chiorazzi N. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood*. 2011 Sep 29; 118(13):3470-8.

- Manshouri T, Do KA, Wang X, et al. Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and prognostic significance. *Blood*. 2003; 101: 2507-2513.
- Matthews C, Catherwood M, Morris TC, Alexander HD. Routine analysis of IgVH mutational status in CLL patients using BIOMED-2 standardized primers and protocols. *Leuk Lymphoma*. 2004 (9): 1899-904.
- Marti GE, Carter P, Abbasi F, et al. B-cell monoclonal lymphocytosis and B-cell abnormalities in the setting of familial B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2003; 52: 1-12.
- Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al, On behalf of The International Familial CLL Consortium. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Br J Haematol* 2005; 130: 325-32.
- Matrai Z, Lin K, Denny M, et al. CD38 expression and Ig VH gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood*. 2001; 97: 1902-1903.
- Matrai Z. CD38 as a prognostic marker in CLL. *Hematology*. 2005 Feb; 10(1):39-46.
- Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, García Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of LLC. *Leukemia* (1994) 8 (10): 1640-45.
- Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, Hamblin T, Lens D, Swansbury GJ, Catovsky D. 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.
- Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 2000 Mar; 4(1): 22-47.
- Mauro FR, Foa R, Cerretti R, et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood*. 2000; 95: 2786-2792.
- Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, Montserrat E, Gil J, Colomer D, Pastor-Anglada M. Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003 Mar 15; 101(6):2328-34.
- Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1987; 60 (11): 2712-2716.

- Molica S, Vitelli G, Levato D, Gandolfo GM, Liso V. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *British Journal Haematology*. 1999; 107: 605-610.
- Molica S, Vacca A, Ribatti D, et al. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 100: 3344-3351.
- Molica S, Vitelli G, Levato D, Giannarelli D, Vacca A, Cuneo A, Ribatti D, Digiesi G. Serum angiogenin is not elevated in patients with early B-cell chronic lymphocytic leukemia but is prognostic factor for disease progression. *European Journal Haematology*. 2004 July; 73 (1): 36-42.
- Molica S, Mauro F, Cilea V, Giannarelli D, Lauria F, Rotoli B, Cortelezzi A, Liso V and Foa R. The utility of a prognostic index for predicting time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia: the GIMEMA experience. *Haematologica* 2010; 95 (3): 464-469.
- Molica S, Mauro R, Giannarelli D, et al. Differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-lymphocytosis according to clinical outcome: on behalf of the GIMEMA chronic lymphoproliferative diseases working group. *Haematologica*. 2011; 96:277.
- Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica/the hematology journal*. 2005; 90(3): 391-399.
- Montserrat E, Sánchez-Binoso J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: analysis of its prognostic significance. *British Journal Haematology*. 1986; 62: 567-575.
- Montserrat E. Leucemia linfática crónica: presenta y futuro. *Haematologica* (ed. Esp.), volumen 86, supl1, Octubre 2.001.
- Morabito F, Mangiola M, Oliva B, Stelitano C, Callea V, Deaglio S, Iacopino P, Brugiattelli M, Malavasi F. Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2001 Nov; 25 (11): 927-32.
- Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morill RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK and Catovsky D. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. 1997 Oct; 108 (4): 378-82.
- Morton LM, Curtis RE, Linet MS, Bluhm EC, Tucker MA, Caporaso N, Ries LA, Fraumeni JF Jr. Second malignancy risks after non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: differences by lymphoma subtype. *J Clin Oncol*. 2010 Nov 20; 28 (33):4935-44.
- NCCN – National Comprehensive Cancer Network – Guidelines, Versión 3.2011.

- Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, López A, Henriques AF, Sánchez ML, Jara-Acevedo M, Rasillo A, González M, Fernández-Navarro P, Vega T, Orfao A; Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL. 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.
- Nollet F, Cauwelier B, Billiet J, Selleslag D, Van Hoof A, Louwagie A, Criel A. Do B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with Ig VH 3-21 genes constitute a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Vol 100, N° 3 (August 1), 2002: 1097-1099.
- Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Zent CS, Call TG, Bone ND, Laplant B, Dewald GW, Tschumper RC, Jelinek DF, Witzig TE, Kay NE. Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 10; 27(11):1844-9.
- O'Brien SM, Katarjian HM, Cortes J, et al. Result of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2001a; 19: 1414-1420.
- O'Brien SM, Katarjian HM, Thomas DA, et al. Rituximab dose escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2001b; 19: 2165-2170.
- Oliveira AC, de la Banda E, Domingo-Domenech E, Encuentra M, Mercadal S, Domingo A, Alonso E, Espinet B, Grau J, De Sevilla AF, Gonzalez-Barca E. Prospective study of clinical and biological prognostic factors at diagnosis in patients with early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011 Mar; 52(3):429-35.
- Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*. Vol 363. January 10, 2004: 105-111.
- Oscier DG, Gardiner AC, Mold SJ, et al. Multivariate analysis of prognosis factors in CCL: clinical stga, IGVH gene mutational status and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*. 2002; 100: 1177-1184.
- Osterborg A, Mellstedt H, Keating M. Clinical effects of alemtuzumab (Campath-1H). in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol*. 2002; 19 (supple): S21-S26.
- Ottaggio L, Viaggi S, Zunino A, Zupo S, Rossi E, Spriano M, Abbondandolo A, Ferrarini M. Chromosome aberrations evaluated by comparative genomic hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: correlation with CD38 expression. *Haematologica*. Vol.88 (07): July 2003.

- Rachel JM, Zucker ML, Fox CM, Plapp FV, Menitove JE, Abbasi F, Marti GE. Monoclonal B-cell lymphocytosis in blood donors. *Br J Haematol*. 2007 Dec; 139 (5): 832-6.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood*. 1975; 46: 219-234.
- Rai KR, Han T. Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1990 Apr; 4(2):447-56.
- Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1750-1757.
- Rai K, Hallek M. Future prospects for alemtuzumab (MabCampath). *Med Oncol*. 2002; 19 (supple): S57-S63.
- Rassenti LZ, PhD, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay MD, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2004; 351: 893-901.
- Ravandi F, O'Brien S. Immune defects in patients with chronic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2006; 55:197–209.
- Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood*. 2002; 100: 2289-2290.
- Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 2008; 359 (6): 575-583.
- Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:430-9.
- Reddy KS. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol*. 2006 Mar; 132(6):705-22.
- Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, Formigaro L, Rizzotto L, Tammiso E, Saccenti E, Bardi A, Cavazzini F, Ciccone M, Nichele I, Pizzolo G, Zaja F, Fanin R, Galienu P, Dalsass A, Mestichelli F, Testa N, Negrini M, Cuneo A. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood*. 2012 Mar 8; 119(10):2310-3.

- Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, et al. Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first line therapy in chronic lymphocytic leukemia: report of a prospective, randomized, multicenter trial. *Blood*. 2000; 96:2723-2729.
- Robak T, Blonski JZ, Gora-Tybor J, Jamroziak K, Dwilewicz-Trojaczek J, Tomaszewska A, Konopka L, Ceglarek B, Dmoszynska A, Kowal M, Kloczko J, Stella-Holowiecka B, Sulek K, Calbecka M, Zawilska K, Kuliczowski K, Skotnicki AB, Warzocha K, Kasznicki M; Polish Leukemia Group (PALG CLL2). Cladribine alone and in combination with cyclophosphamide or cyclophosphamide plus mitoxantrone in the treatment of progressive chronic lymphocytic leukemia: report of a prospective, multicenter, randomized trial of the Polish Adult Leukemia Group (PALG CLL2). *Blood*. 2006 Jul 15; 108 (2): 473-9.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *J Exp Med*. 2001; 194: 1625-1638.
- Rozman C, Hernandez-Nieto L, Montserrat E, Bruges R. Prognostic significance of bone marrow patterns in chronic lymphocytic leukemia. *British Journal Haematology*. 1981; 47: 529-537.
- Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM et al. Bone marrow histologic patterns - the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood*, Vol 64, 1984: 642-648.
- Sarfati M, Chevret S, Chastang C, et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996; 88: 4259-4264.
- Sarsotti E, Marugan I, Benet I, Terol MJ, Sánchez-Izquierdo D, Tormo M, Rubio-Moscardo F, Martínez-Climent JA and García-Conde J. Bcl-6 mutation status provides clinically valuable information in early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2004 April 18 (4): 743-46.
- Schetelig J, Thiede C, Bornhauser M et al. Evidence of a graft-versus-leukemia effect in chronic lymphocytic leukaemia after reduced-intensity conditioning and allogeneic stem-cell transplantation: The Cooperative German Transplant Study Group. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 2747-2753.
- Schroer R, Griesinger F, Trumper L, et al. Combined analysis of ZAP70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2005; 19: 750-758.

- Shanafelt Tait D, Geyer Susan M, Kay Neil E. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood*, Vol 103, N° 4 (February 15), 2004: 1202-1210.
- Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, Jenkins RB, Paternoster SF, Smoley SA, Stockero KJ, Nast DM, Flynn HC, Tschumper RC, Geyer S, Zent CS, Call TG, Jelinek DF, Kay NE, Dewald GW. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2006 Oct 1; 24 (28): 4634-41.
- Shanafelt Tait D, Jenkins G, Call T, Zent C, Slager S, Bowen D, Schwager S, Hanson C, Jelinek D and Kay N. Validation of new prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Cancer*, 2009a, January 15; 115 (2): 363-372.
- Shanafelt TD, Kay NE, Jenkins G, et al. B-cell count and survival: differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-cell lymphocytosis based on clinical outcome. *Blood*, 2009b, 113 (18): 4188-4196.
- Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, et al. Natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009c, 27: 3959-63.
- Sherif Ibrahim, Keating M, Do K-A, O'Brien S, Huh Yang, Jilani I, Lerner S, Kantarjian H, Albitar M. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Vol 98, N° 1 (July 1), 2001: 181-186.
- Shim YK, Vogt RF, Middleton D, Abbasi F, Slade B, Lee KY, Marti GE. Prevalence and natural history of monoclonal and polyclonal B-cell lymphocytosis in a residential adult population. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007 Sep; 72 (5): 344-53.
- Smoley SA, Van Dyke DL, KAY NE, et al. Standardization of fluorescence in situ hybridization studies on chronic lymphocytic leukemia (CLL) blood and marrow cells by the CLL Reseach Consortium. *Cancer Genet Cytogenet* 2010, 203: 141-148.
- Snowden RT, Sun X-M, Dyer MJS and Cohen GM. Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in crhonic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1. *Leukemia* (2003) 17, 1981-1989.
- Sorrow ML, Storer BE, Sandmaier BM, Maris M, Shiruzu J, Maziarz R et al. Five-year follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia treated with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4912-4920.

- Stevenson FK, Caligaris-Cappio. Chronic lymphocytic leukaemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*, Vol 103, N° 12 (June 15), 2004: 4389-4395.
- Stilgenbauer S, Dohner H. Camphath-1H induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N Engl J Med*. 2002; 347: 452-453.
- Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, Benner A, Leupolt E, Winkler D, Kröber A, Kienle D, Lichter P and Döhner H. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* 2007; 92 (09): 1242-1245.
- Tam CS, O'Brien S, Wierda W, Kantarjian H, Wen S, Do KA, Thomas DA, Cortes J, Lerner S, Keating MJ. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008 Aug 15; 112 (4): 975-80.
- 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 (5): 957-954.
- Thomas J, MD, PhD. Chronic lymphocytic leukemia. *Current Opinion in Hematology* 2000, 7: 223-234.
- Thurmes P, Call T, Slager S, et al. Comorbid conditions and survival in unselected newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2008; 49: 49-56.
- Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thörn I, Söderberg O, Hultdin M, Botling J, Enblad G, Sällström, Sundström C, Roos G, Rosenquist R. Somatically mutated Ig VH 3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Vol 99, N° 6 (March 15), 2002: 2262-2264.
- Tsimberidou AM, Tam C, Wierda W, et al. β -2 microglobulin (β 2M) is an independent prognostic factor for clinical outcomes in patients with CLL treated with frontline fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab (FCR) regardless of age, creatinine clearance (CrCl). 2007. ASCO Annual Meeting Proceeding Part I. *J Clin Oncol*. 2007: 25(18S June 20 suppl): 7034.
- Tsimberidou AM, Tam C, Abruzzo LV, O'Brien S, Wierda WG, Lerner S, Kantarjian HM, Keating MJ. 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.

- Vallespi T, Montserrat E, Sanz MA. Chronic lymphocytic leukemia: prognostic value of lymphocyte morphological subtypes. A multivariate survival analysis in 146 patients. *Br J Haematology*. 1991; 77 (4): 478-485.
- Villamor N, Montserrat E, Urbano-Ispizua A, Ribera JM, Rovira M, Vives Corrons JL, Rozman C. Effect of treatment with recombinant interferon alfa on natural killer activity in patients with chronic type B lymphatic leukemia. *Sangre (Barc)*. 1989 Dec; 34 (6): 485-8.
- Voutsadakis IA. Apoptosis and the pathogenesis of lymphoma. *Acta Oncol*. 2000; 39 (2): 151-6.
- Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, Morel P, Fenaux P. P53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*. 1994 Nov 1; 84 (9): 3148-57.
- Weinberg JB, Volkheimer AD, Chen Y, et al. Clinical and molecular predictors of disease severity and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Am J of Hematol* 2007; 82 (12): 1063-1070.
- Wierda WG, Johnson MM, Do KA, Manshoury T, Dey A, O'Brien S, Giles FJ, Kantarjian H, Thomas D, Faderl S, Lerner S, Keating M, Albitar M. Plasma interleukin 8 levels predicts for survival in chronic lymphocytic leukemia. *British J. Haematology*. 2003 Feb; 120(3): 452-6.
- Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do KA, Cortes J, Thomas D, García-Manero G, Koller C, Beran M, Giles F, Ravandi F, Lerner S, Kantarjan H y Keating M. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1 June 2007, Vol 109, N° 11: 4679-4685.
- Xu W, Li JY, Miao KR, Cao X, Liu Q, Fan L, Qiao C, Wu YJ. The negative prognostic significance of positive direct antiglobulin test in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2009 September; 50 (9): 1482-1487.
- Zhang LY, Ibbotson RE, Orchard JA, Gardiner AC, Seear RV, Chase AJ, Oscier DG and Cross NCP. P2X7 polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: lack of correlation with incidence, survival and abnormalities of chromosome 12. *Leukemia* (2003) 17, 2097-2100.
- Zenz T, Kröber A, Scherer K, 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.
- Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 10; 28 (29): 4473-9.

- Zenz T, Gribben JG, Hallek M, Dhöner H, Keating MJ, Stilgenbauer S. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood*, 2012; 119 (18): 4101-4107.
- Zwiebel JA, Cheson BD. Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Semin Oncol*. 1998 Feb; 25 (1): 42-59.

PUBLICACIONES

9. PUBLICACIONES.

- Relación de la expresión del antígeno CD38 con el patrón histopatológico de la médula ósea, el score inmunofenotípico y el tratamiento en pacientes diagnosticados de LLC-B. A.González Serna, F. Ortuño, M. Blanquer, F.M. Ruiz, J. Gómez Espuch, J.M. Moraleda, V. Vicente. XLV Reunión Nacional de la AEHH. XIX Congreso de la SETH. Octubre 2.003.
- Estudio citogenético y de FISH en 21 pacientes afectos de leucemia linfática crónica. L. Ripolles, M. Ortega, N. Baena, F. Ortuño, A.González, F. Ferrer, Y. Alvarez, M. Peris, M.C. Sánchez, M.R. Caballin, M.D. Coll. XLV Reunión Nacional de la AEHH. XIX Congreso de la SETH. Octubre 2.003.
- ¿Es suficiente una única variable inmunofenotípica o citogenética para la estratificación de pacientes con LLC? A. González Serna, F. Ortuño, J.M. Moraleda, A. Cascales, A. Martínez, C. Funes, J. Ibáñez, M.M. Osma, F. Ferrer, I. Sánchez, J.M. Sánchez-Rivas, V. Vicente. XLVI Reunión Nacional de la AEHH. XX Congreso de la SETH. Octubre 2.004.
- Expresión del antígeno de superficie CD38 como factor pronóstico en 120 pacientes diagnosticados de leucemia linfática crónica B? A. González Serna, F. Ortuño, J.M. Moraleda, F. Arriba, I. Heras, A. Martínez, C. Funes, J. Ibáñez, M.M. Osma, F. Ferrer, I. Sánchez, V. Vicente. XLVI Reunión Nacional de la AEHH. XX Congreso de la SETH. Octubre 2.004.
- Delección en 13q14 y evolución en pacientes con leucemia linfática crónica. L. Repolles, M. Ortega, N. Baena, F. Ortuño, A. González, F. Ferrer, J.A. Soler, J. Ojanguren, Losada, Y. Alvarez, M. Peris, M.C. Sánchez, M.R. Caballón, M.D. Coll. XLVI Reunión Nacional de la AEHH. XX Congreso de la SETH. Octubre 2.004.
- Relación de la expresión del antígeno de superficie con el estudio inmunofenotípico (score y otros marcadores) y la supervivencia en 103 pacientes diagnosticados de LLC-B. A. González Serna, F. Ortuño, J.M. Moraleda, C. Funes, M. Osma, A. Periago, f. Ferrer, I. Sánchez y V. Vicente. XLVII Reunión Nacional de la AEHH. XXI Congreso de la SETH. Octubre 2.005.
- Alteraciones citogenéticas en 332 pacientes con LLC-B y relación con el estado mutacional del segmento variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgVH). J.A. Hernández, P. Martín-Jiménez, M. Sierra, V. Sandoval, R. Fisac, A. García de Coca, M. Romero, I. Recio, J. Galende, A. González Serna, G. López-Núñez, R.M. López, F. Ortuño,

M. del Pozo, M. González y J.M. Hernández. XLVIII Reunión Nacional de la AEHH. XXII Congreso de la SETH. Octubre 2.006.

- Genetic abnormalities and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer, Genetics and Cytogenetics*, 171 (2.006) 57-64.
- Evolución clonal en pacientes con LLC. La adquisición de nuevas aberraciones citogenéticas se relaciona con la expresión de CD38 al diagnóstico. González Serna, A., Fernández A., Jerez A., Cano H., Antón A., Sánchez Vega B., Osma MM., Ortuño FJ., Vicente V. L Reunión Nacional de la AEHH. XXIV Congreso de la SETH. Octubre 2.008.
- Características clínicas y evolutivas en una serie de 255 pacientes diagnosticados de leucemia linfática crónica B. González Serna, A., Osma MM., Jerez A., Sánchez Blanco JJ., Pérez Ceballos E., Ortuño FJ., Vicente V. L Reunión Nacional de la AEHH. XXIV Congreso de la SETH. Octubre 2.008.
- Estudio piloto de seguridad y tolerancia al tratamiento con pentostatina-ciclofosfamida +/- Rituximab en pacientes añosos diagnosticados de LLC-B, refractarios o en recaída. González Serna, A., Jerez A., Fernández A., Sánchez Blanco JJ., Osma MM., Ortuño FJ., Vicente V. L Reunión Nacional de la AEHH. XXIV Congreso de la SETH. Octubre 2.008.
- Clonal evolution in CLL patients. Acquisition of new cytogenetic aberrations is related to the expression of CD38 at diagnosis. González Serna, Ana, Osma M., Ortuño F., Cano H., Vicente V. 16th Congress of the European Hematology Association. June 2.011.
- Anomalías cromosómicas en leucemia linfática crónica B. Relacion con variables clínico biológicas, tratamiento y supervivencia. A. González Serna, M.M. Osma, F.J. Ortuño, H. Cano, M.J. Moreno, J.M. Torregrosa, J.J. Sánchez Blanco y V. Vicente. LIII Reunión Nacional de la AEHH. XXVII Congreso de la SETH. Octubre 2.011.
- Linfocitosis monoclonal de significado incierto: la expresión de CD38 al diagnóstico es predictiva del tiempo al primer tratamiento. M.M. Osma, A. González Serna, J.M. Torregrosa, H. Cano, A. Fernández, I. Sánchez Serrano, A. Jerez, M.J. Moreno, F.J. Ortuño y V. Vicente. LIII Reunión Nacional de la AEHH. XXVII Congreso de la SETH. Octubre 2.011.
- Manuscrito en preparación: Proposal of a nomogram and a new prognostic index based on integrated clinical, immunophenotypic and cytogenetic features in CLL patients at diagnosis.