



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio prospectivo de factores pronósticos en pacientes con linfocitosis B monoclonal o estadios iniciales de la leucemia linfática crónica

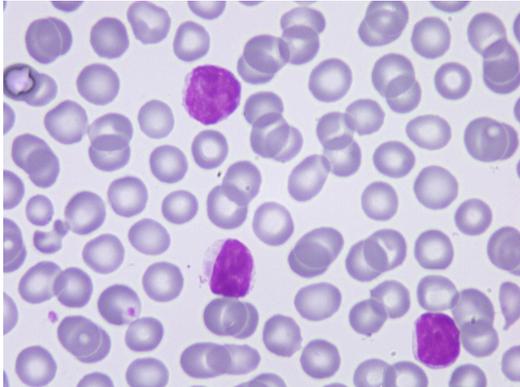
Ana Carla de Oliveira Ramos



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



**ESTUDIO PROSPECTIVO DE
FACTORES PRONÓSTICOS
EN PACIENTES CON
LINFOCITOSIS B
MONOCLONAL O ESTADIOS
INICIALES DE LA LEUCEMIA
LINFÁTICA CRÓNICA**

Tesis Doctoral

Ana Carla de Oliveira Ramos

Dirección

Prof. Dra. Eva González Barca

Título:

“Estudio prospectivo de factores pronósticos en pacientes con linfocitosis B monoclonal o estadios iniciales de la leucemia linfática crónica”.

Doctorando:

Ana Carla de Oliveira Ramos

Para obtener el título de Doctor por la
Universitat de Barcelona.

Dirigida por:

Prof. Dra. Eva González Barca

Programa de Doctorado de Medicina

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

2016

À memória do meu pai. À minha mãe.

Aos meus dois queridos irmãos.

A Joni, Victor e Daniel.

*“Porque eu só preciso de pés livres,
de mãos dadas e de olhos bem abertos”*

Guimarães Rosa.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	10
RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS	14
INTRODUCCIÓN	18
1. Factores pronósticos disponibles en la práctica clínica	24
1.1. Variables clásicas	24
1.1.1. Esquemas de estadiaje de Rai y Binet	24
1.1.2. Variables relacionadas a los linfocitos en SP	26
a. Morfología linfocitaria atípica	26
b. Número absoluto de linfocitos al diagnóstico	28
c. Tiempo de duplicación linfocitario	28
1.1.3. Marcadores séricos	29
a. Lactato deshidrogenasa	29
b. Beta 2 microglobulina	29
c. Timidina kinasa	30
d. CD23 soluble	30
1.1.4. Biopsia de medula ósea	31
1.2. Variables biológicas	32
1.2.1. Inmunofenotípicas	32
a. CD38	33
b. ZAP-70	34
1.2.2. Citogenéticas	35

2. Factores pronósticos no fácilmente disponibles en la práctica	
clínica	39
2.1. Estado mutacional de la IgVH	39
2.2. Mutaciones en otros genes	40
HIPÓTESIS	44
OBJETIVOS	46
PACIENTES Y MÉTODOS	48
1. Identificación de pacientes y recogida de datos clínicos	48
2. Definiciones	50
3. Recogida de muestras	50
4. Procesamiento de las muestras	51
4.1. Estudio inmunofenotípico por citometría de flujo	51
4.2. Citogenética convencional	53
4.3. Técnica de FISH	54
5. Análisis estadístico	55
RESULTADOS	56
1. Trabajo 1: “Prospective study of clinical and biological prognostic factors at diagnosis in patients with early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia”	56
1.1. Datos clínicos y biológicos al diagnóstico	56
1.2. Análisis de supervivencia y estudio de los factores pronósticos	59

Artículo correspondiente	65
2. Trabajo 2: “Prospective study of prognostic factors in asymptomatic patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia-like lymphocytosis: the cut-off of $11 \times 10^9/L$ monoclonal lymphocytes better identifies subgroups with different outcomes”	72
2.1. Datos clínicos y biológicos al diagnóstico	72
2.2. Análisis de supervivencia y estudio de los factores pronósticos	75
Artículo correspondiente	84
DISCUSIÓN	90
1. Índices pronósticos en LLC	90
2. Valoración de las variables pronosticas	108
2.1. Presencia de adenopatías al diagnóstico	108
2.2. Morfología linfocitaria atípica	109
2.3. Número absoluto de linfocitos B clonales superior a $11 \times 10^9/L$	110
2.4. B2M elevada	111
2.5. Positividad para CD38	112
2.6. Delección 11q-	113
2.7. Delección 17p-	114
CONCLUSIONES	116
Trabajo 1	116
Trabajo 2	116

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
ANEXOS	132
Anexo 1	132
Anexo 2	133
AGRADECIMIENTOS	134

ABREVIATURAS

+12	Trisomía del cromosoma 12
6q-	Delección del brazo largo del cromosoma 6
11q-	Delección del brazo largo del cromosoma 11
13q-	Delección del brazo largo del cromosoma 13
14q	Brazo largo del cromosoma 14
17p-	Delección del brazo corto del cromosoma 17
AUC	<i>Area under the curve</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated gene</i>
B2M	Beta 2 microglobulina
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2 genes</i>
BIRC3	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 3 gene</i>
BMO	Biopsia de medula ósea
CBA	<i>Chromosome banding analysis</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DAPI-II	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EMG	Esplenomegalia

ERIC	<i>European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia</i>
FA	Fosfatasa alcalina
FAB	<i>French American British morphological classification</i>
FC	Fludarabina + ciclofosfamida
FCR	Fludarabina + ciclofosfamida + rituximab
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Hb	Hemoglobina
HMG	Hepatomegalia
HR	<i>Hazard ratio</i>
HUB	Hospital Universitari de Bellvitge
IC	Intervalo de confianza
ICML	<i>International Conference on Malignant Lymphoma</i>
ICO-HDiR	Institut Catalá d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals
IFN	Interferon
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M

IgVH	Región variable del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas
ISCN	<i>International System of Human Cytogenetic Nomenclature</i>
IPI-CCL	<i>International prognostic index on chronic lymphocytic leukemia</i>
LBM	Linfocitosis B monoclonal
LCA	Linfocitosis clonal asintomática
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLC	Leucemia linfática crónica
LLP	Linfoma de linfocito pequeño
Log	Logaritmo
MO	Médula ósea
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NOTCH1	<i>Notch homolog 1 gene</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PE	Ficoeritrina
Percp	<i>Peridinin chlorophyll</i>
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>

RR	Riesgo relativo
SF3B1	<i>Splicing factor 3B gene, subunit 1</i>
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de evento
SLP	Supervivencia libre de progresión
SLT	Supervivencia libre de tratamiento
SP	Sangre periférica
SPSS	<i>Statistical package for the social sciences</i>
TC	Tomografía computadorizada
TDL	Tiempo de duplicación linfocitario
THP	Tiempo hasta progresión
TK	Timidina quinasa
TPA	Forbol 12-miristato 13-acetato
TP53	<i>Tumor protein p53 gene</i>
TPT	Tiempo hasta el primer tratamiento
TTM	<i>Total tumour mass score</i>
ZAP-70	<i>Zeta associated protein 70</i>

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1: Criterios para iniciar tratamiento en la LLC.

Tabla 2: Esquema de estadiaje de Rai.

Tabla 3: Esquema de estadiaje de Binet.

Tabla 4: Mediana de supervivencia en meses según estadiaje de Rai y Binet.

Tabla 5: *Score* inmunofenotípico para el diagnóstico de LLC según Matutes *et al.* La célula de la LLC debe presentar positividad para CD19 además de las características descritas en la tabla abajo. Cada una de ellas confiere 1 punto en el *score*.

Tabla 6: Modelo jerárquico de cinco categorías pronosticas en LLC según análisis de FISH.

Tabla 7: Factores pronósticos presentes al diagnóstico analizados en el estudio.

Tabla 8: Protocolo de estudio inmunofenotípico de LLC.

Tabla 9: Características clínicas al diagnóstico en 135 pacientes.

Tabla 10: Características inmunofenotípicas y citogenéticas al diagnóstico en 135 pacientes.

Tabla 11: Análisis univariante de factores pronósticos al diagnóstico para SLP en 114 pacientes con LLC Rai 0-1.

Tabla 12: Análisis multivariante de factores pronósticos biológicos al diagnóstico para SLP en 114 pacientes con LLC Rai 0-1.

Tabla 13: Clasificación y estadio según Rai de los 307 pacientes con neoplasias linfoides con fenotipo de LLC.

Tabla 14: Características de laboratorio, inmunofenotípicas y citogenéticas al diagnóstico en 231 pacientes con LCA.

Tabla 15: Análisis univariante de factores pronósticos al diagnóstico para SLP y SLT en 231 pacientes con LCA.

Tabla 16: Análisis multivariante de factores pronósticos al diagnóstico en 231 pacientes con LCA.

Tabla 17: Resumen del trabajo 1.

Tabla 18: Resumen del trabajo 2.

Tabla 19: Resumen de los principales estudios retrospectivos de factores pronósticos en LLC de 1990 a 2015, que incluyen análisis multivariante.

Tabla 20: Resumen de los principales estudios prospectivos de factores pronósticos en LLC de 1990 a 2015, que incluyen análisis multivariante.

Tabla 21: Resumen de las cuatro principales propuestas de índices pronósticos en LLC.

FIGURAS

Figura 1: Linfocitos de LLC en una extensión de SP al microscopio. Las flechas negras corresponden al típico linfocito maduro, pequeño, de cromatina cuarteada. Las flechas azules señalan sombras de Gumprecht, muy características de la LLC y que corresponden a los mismos linfocitos de la enfermedad que se rompen al realizar la extensión de SP.

Figura 2: Adenopatías cervicales voluminosas y hepatoesplenomegalia como criterios de tratamiento en un paciente con LLC.

Figura 3: Extensión de SP de un paciente con LLC de morfología atípica. Las flechas negras corresponden a prolinfocitos (tamaño mayor y aspecto inmaduro con nucléolo central). La flecha azul señala un centrocito.

Figura 4: Preparación en hematoxilina-eosina de una BMO con un patrón de infiltración difuso por LLC.

Figura 5: Trisomía del cromosoma 12 en un cariotipo convencional.

Figura 6: Delección 11q- por FISH en tres núcleos en interfase. Una señal verde significa la pérdida de uno de los alelos del gen ATM. Las dos señales rojas confirman la presencia de los dos alelos del gen TP53.

Figura 7: Curvas de Kaplan Meier para 135 pacientes: (A) SG, (B) SLP y (C) SLT.

Figura 8: Curvas de Kaplan Meier para SLP en 114 pacientes con estadios 0-1 de Rai en función de: (A) presencia de adenopatías al diagnóstico ($p<0.001$), (B) positividad para CD38 al diagnóstico ($p<0.001$) y (C) presencia de 17p- al diagnóstico ($p=0.05$).

Figura 9: Curvas de Kaplan Meier para SLP en 231 pacientes con LCA en función de: (A) morfología atípica de los linfocitos al diagnóstico ($p<0.001$) y (B) presencia de 11q- al diagnóstico ($p=0.007$).

Figura 10: Curvas de Kaplan Meier para SLT en 231 pacientes con LCA en función de: (A) morfología atípica de los linfocitos al diagnóstico ($p=0.001$) y (B) B2M elevada al diagnóstico ($p=0.002$) y (C) presencia de 11q- al diagnóstico ($p=0.031$).

Figura 11: Curvas ROC para (A) SLP y (B) SLT según el valor de 11×10^9 /L linfocitos B clonales.

Figura 12: Curvas de Kaplan Meier en 231 pacientes con LCA en función del límite de 11×10^9 /L linfocitos B clonales al diagnóstico: (A) SLP ($p=0.001$) y (B) SLT ($p=0.023$).

Figura 13: Curvas de Kaplan Meier en 231 pacientes con LCA en función del límite de 5×10^9 /L linfocitos B clonales al diagnóstico para (A) SLP ($p=0.241$) y (B) SLT ($p=0.323$).

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfática crónica (LLC) es el tipo de leucemia más frecuente en los países occidentales y su incidencia aumenta progresivamente con la edad, afectando principalmente pacientes en la sexta década de la vida (1). En el área geográfica del Baix Llobregat (área de referencia del Institut Catala d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals; ICO-HDiR) es la neoplasia linfoide más común con una incidencia estimada de cinco casos por 100.000 habitantes/año (2). Se caracteriza por una proliferación clonal de linfocitos pequeños de estirpe B en sangre periférica (SP), médula ósea (MO), bazo y ganglios linfáticos. Estos linfocitos tienen un aspecto maduro al microscopio, con escaso citoplasma y cromatina cuarteada y presentan un fenotipo de membrana característico que incluye CD19, CD5 y CD23; expresión negativa o débil de CD22, CD79b y FMC-7, además de poca expresión de cadenas ligeras de superficie (3). La figura 1 muestra linfocitos de LLC en una extensión de SP al microscopio.

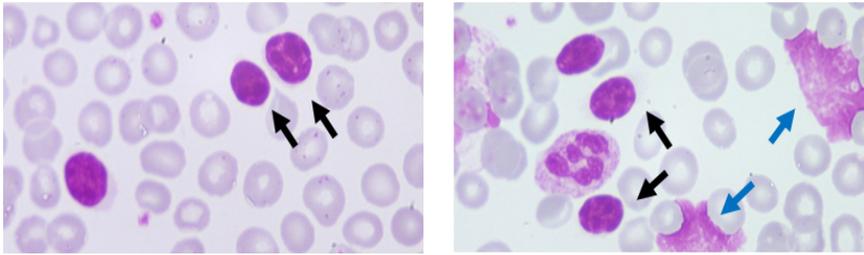


Figura 1: Linfocitos de LLC en una extensión de SP al microscopio. Las flechas negras corresponden al típico linfocito maduro, pequeño, de cromatina cuarteada. Las flechas azules señalan sombras de Gumprecht, muy características de la LLC y que corresponden a los mismos linfocitos de la enfermedad que se rompen al realizar la extensión de SP.

Desde 2008, la definición de LLC exige la presencia de más de 5×10^9 /L linfocitos B monoclonales en SP detectada por citometría de flujo. Los casos con afectación ganglionar y/o hepatoesplénica y menos de 5×10^9 /L linfocitos de LLC en SP se denominan linfoma de linfocito pequeño (LLP), mientras aquellos con menos de 5×10^9 /L linfocitos B monoclonales y sin ningún signo de enfermedad (asintomáticos, sin citopenias, sin adenopatías o visceromegalias) se clasifican como linfocitosis B monoclonal (LBM) (4). Sin embargo, el límite de 5×10^9 /L linfocitos B monoclonales es arbitrario, ya que no ha sido validado en estudios prospectivos para separar distintas formas clínicas de la LLC con diferentes pronósticos.

Aproximadamente un 70% de casos de LLC se diagnostican en fases iniciales (5), como linfocitosis aislada en una analítica de rutina, estando el paciente asintomático. El curso clínico de la enfermedad es heterogéneo. La mayoría de pacientes presenta una progresión lenta a lo largo de años hasta presentar criterios de tratamiento (tabla 1). Estos criterios están definidos y consensuados por expertos desde hace décadas pero aún son válidos en la actualidad (4, 6). Se basan en esperar los signos de progresión o “actividad” de la enfermedad, ya que tratar el paciente en estadios iniciales o con LLC estable no mejora su supervivencia (7, 8). La figura 2 muestra adenopatías cervicales visibles por exploración física en un paciente con LLC además de adenopatías y esplenomegalia voluminosas por tomografía computadorizada (TC) como criterios para iniciar tratamiento.

Cuando se presenta alguno de estos criterios, el tratamiento de los pacientes con LLC puede aportar beneficio clínico y tiene como objetivo la remisión completa o parcial de la enfermedad o simplemente el control de síntomas, todo ello en función de la edad y comorbilidades del paciente. A partir de aquí, la historia natural de la LLC se caracteriza por recaídas, que pueden ser más tardías o más tempranas, con o sin criterios de tratamiento pero con periodos en remisión progresivamente más cortos.

Tabla 1: Criterios para iniciar tratamiento en la LLC (4, 6).

Signos de insuficiencia medular progresiva: aparición o empeoramiento de anemia o trombocitopenia
Esplenomegalia masiva (> 6cm reborde costal) o progresiva o sintomática
Adenopatías voluminosas (> 10cm de diámetro) o progresivas o sintomáticas
Linfocitosis progresiva: aumento de 50% en un periodo de 2 meses o TDL* inferior a 6 meses
Anemia o trombocitopenia autoinmunes que no responden a tratamiento corticoideo
Síntomas constitucionales relacionados a la enfermedad: <ul style="list-style-type: none">- Pérdida de peso igual o superior al 10% del peso corporal en un periodo de 6 meses;- Astenia significativa atribuible a la enfermedad (ECOG* \geq 2);- Fiebre de 38°C o más continua por un periodo superior a 2 semanas sin causa infecciosa que la justifique;- Sudoración nocturna por más de 1 mes sin causa infecciosa que la justifique.

*TDL: tiempo de duplicación linfocitario; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group* (ver anexo 1)

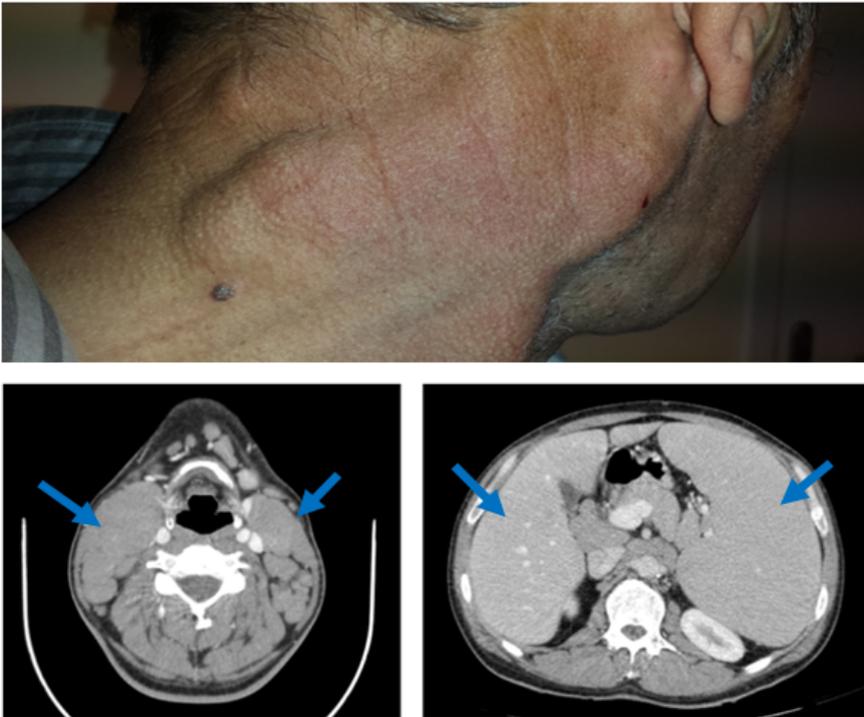


Figura 2: Adenopatías cervicales voluminosas y hepatoesplenomegalia como criterios de tratamiento en un paciente con LLC.

Sin embargo, hay una minoría de pacientes que a pesar de diagnosticarse en estadios iniciales de la LLC, presentan una rápida progresión y requieren tratamiento de forma precoz. Hay una serie de variables clínicas y de laboratorio descritas en la literatura que, cuando están presentes al diagnóstico de la enfermedad, pueden ayudar a predecir la evolución de la misma.

Las variables que tienen valor pronóstico se pueden dividir en:

(1) Factores pronósticos disponibles en la práctica clínica habitual, que se subdividen en (a) variables clásicas y (b) variables biológicas;

(2) Factores pronósticos no fácilmente disponibles en la práctica clínica habitual.

En el primer grupo, las variables clásicas corresponden a variables clínicas o fácilmente evaluadas mediante analíticas convencionales. Rápidamente se han ido desplazando por las variables biológicas, que comprenden las alteraciones genéticas y la expresión de antígenos y proteínas de membrana celular. Estas variables se estudian mediante técnicas de citogenética y citometría de flujo, disponibles también en la rutina diaria de la mayoría de centros. El segundo grupo corresponde a marcadores descritos más recientemente a nivel genético y molecular que, aunque parecen tener mucha relación con el pronóstico de la LLC, aún no están disponibles en la práctica clínica en la gran mayoría de laboratorios de rutina.

1. Factores pronósticos disponibles en la práctica clínica

1.1. Variables clásicas

1.1.1. Esquemas de estadiaje de Rai y Binet

Los esquemas de estadiaje propuestos por Rai y Binet (tablas 2 y 3) en los años 70-80 son capaces de separar los pacientes con LLC en diferentes grupos con diferentes supervivencias en función de la carga tumoral en el momento del diagnóstico (tabla 4) (9, 10). Son baratos y fácilmente aplicables en la práctica clínica ya que solo requieren la exploración física y un hemograma. Sin embargo, fallan en identificar aquellos casos en estadios precoces que presentarán una progresión rápida de la enfermedad, por lo que en la actualidad no son la mejor herramienta pronostica en el momento del diagnóstico en la mayoría de pacientes.

Tabla 2: Esquema de estadiaje de Rai.

0	Linfocitosis aislada
I	Linfocitosis con adenopatías
II	Linfocitosis con esplenomegalia o hepatomegalia
III	Linfocitosis con anemia (Hb* < 110g/L)
IV	Linfocitosis con trombocitopenia (plaquetas < 100 x 10 ⁹ /L)

*Hb: hemoglobina

Tabla 3: Esquema de estadiaje de Binet.

A	Hasta dos áreas linfoides afectadas*, Hb ≥ 100g/L y plaquetas ≥ 100 x 10 ⁹ /L
B	Tres o más áreas linfoides afectadas*, Hb ≥ 100g/L y plaquetas ≥ 100 x 10 ⁹ /L
C	Hb < 100g/L y/o plaquetas < 100 x 10 ⁹ /L, independiente del número de áreas linfoides afectadas.

*Cuentan como un área linfoide: (1) cabeza y cuello (incluyendo anillo de Waldeyer), (2) axilas uni o bilateral, (3) ingles uni o bilateral, (4) bazo palpable e (5) hígado palpable.

Tabla 4: Mediana de supervivencia en meses según estadiaje de Rai y Binet.

	Mediana de supervivencia (meses)
Rai	
0	>150
1	101
2	71
3	19
4	19
Binet	
A	Comparable a la población control
B	84
C	24

1.1.2. Variables relacionadas a los linfocitos en SP

a. Morfología linfocitaria atípica

Los criterios elaborados por la *French American British morphological classification* (FAB) en 1989 aún se utilizan en la actualidad para clasificar la LLC en típica o atípica de acuerdo con la morfología de los linfocitos en SP (11). Según estos criterios, la morfología atípica puede ser de dos subtipos: (1) subtipo LLC/leucemia prolinfocítica, con más de 10% de prolinfocitos circulantes y (2) subtipo mixto, con más de 15% de linfocitos linfoplasmacíticos o centrocitos circulantes. La figura 3 muestra

prolinfocitos y centrocitos en la extensión de SP de un paciente con LLC atípica.

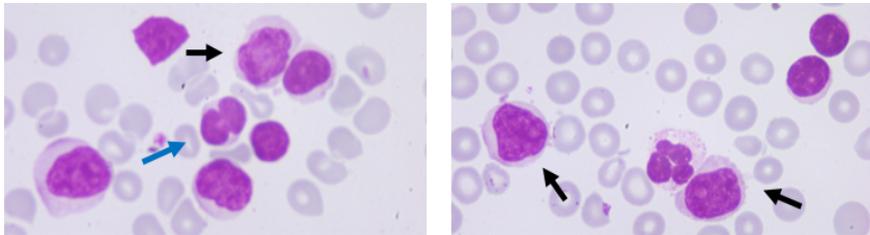


Figura 3: Extensión de SP de un paciente con LLC de morfología atípica. Las flechas negras corresponden a prolinfocitos (tamaño mayor y aspecto inmaduro con nucleólo central). La flecha azul señala un centrocito.

Disponible en prácticamente todos los centros y de bajo coste por consistir un paso básico para el diagnóstico de la enfermedad, la morfología de los linfocitos se ha correlacionado con el pronóstico de la LLC (12-15). Sin embargo, la descripción de nuevos marcadores inmunofenotípicos y citogenéticos ha sustituido rápidamente el interés por esta herramienta pronostica que puede conllevar a algo más de subjetividad entre observadores, de forma que no se han llegado a realizar estudios prospectivos sobre el tema.

b. Número absoluto de linfocitos al diagnóstico

Varios estudios retrospectivos sugieren un número absoluto de linfocitos B al diagnóstico de alrededor de $10\text{-}11 \times 10^9/\text{L}$ como el límite que más se correlaciona con la necesidad de tratamiento y con la supervivencia en la LLC (16-19). Aunque el valor de linfocitos B clonales que separa la LBM de la LLC Rai 0 según las *NCI (National Cancer Institute) Guidelines* de 2008 sea inferior, no hay estudios prospectivos que analicen si esta clasificación diagnóstica tiene un algún valor pronóstico.

c. Tiempo de duplicación linfocitario (TDL)

El TDL es el período de tiempo en el que el número de linfocitos absolutos tarda en duplicarse en un paciente con LLC. Estudios de los años 80-90 describieron el valor pronóstico de un TDL de menos de 12 meses (13, 20, 21). Fácilmente disponible, refleja la actividad de la enfermedad y en la práctica clínica se utiliza como criterio para iniciar tratamiento cuando es inferior a 6 meses (4, 6). Sin embargo, tiene la desventaja de ser una herramienta retrospectiva, no evaluable en el momento del diagnóstico del paciente con LLC.

1.1.3. Marcadores séricos

a. Lactato deshidrogenasa (LDH)

La LDH es una enzima implicada en la formación de lactato para su utilización como fuente de energía por las células normales y tumorales (22). Los niveles séricos de LDH están frecuentemente elevados en varios tipos de cáncer y diferentes síndromes linfoproliferativos. Se ha descrito su correlación con la carga tumoral en estadios avanzados de la LLC, con situaciones de transformación a linfomas agresivos (síndrome de Richter) y con una necesidad de tratamiento más precoz (23-27). No hay sin embargo, estudios prospectivos que analicen el valor pronóstico de este marcador sérico en los estadios precoces de la LLC.

b. Beta 2 microglobulina (B2M)

Los niveles séricos de B2M probablemente se correlacionen con la carga tumoral de la enfermedad, ya que es una proteína secretada constantemente por los linfocitos de la LLC (28). Muchos autores han descrito la correlación entre niveles séricos elevados de B2M y un peor pronóstico (17, 29-32), posiblemente incluso en estadios iniciales de la enfermedad (33). De nuevo, la mayoría de estudios son retrospectivos.

c. Timidina kinasa (TK)

La TK es una enzima que participa en la síntesis del DNA y que es un marcador de proliferación celular ya que se encuentra principalmente en células en división (34). Niveles séricos elevados de TK se han asociado con enfermedad avanzada y/o progresiva en neoplasias linfoides (34). También se ha descrito su correlación con un peor pronóstico en pacientes con LLC en estadios iniciales (35). A pesar de tener un posible papel pronóstico, no está disponible de forma rutinaria en la gran mayoría de laboratorios.

d. CD23 soluble

CD23 es un antígeno de membrana presente en los linfocitos B del que se pueden identificar fragmentos solubles de diversos tamaños y con diferentes funciones, entre ellas inhibir la apoptosis de la propia célula B (36). Se han encontrado niveles séricos elevados de CD23 en pacientes con LLC en fases avanzadas, con enfermedad activa así como con un TDL inferior (37). También se ha descrito su correlación con mayor riesgo de progresión en pacientes con LLC en estadios precoces (36). Así

como la TK, su determinación tampoco está disponible en laboratorios de rutina.

1.1.4. Biopsia de medula ósea (BMO)

Se han descrito cuatro patrones histológicos de infiltración de MO en la LLC: intersticial, nodular, mixto (nodular-intersticial) y difuso (38). Algún estudio ha encontrado correlación entre el patrón difuso de infiltración de la MO con un curso clínico más agresivo de la LLC cuando se compara con los demás patrones histológicos de infiltración (39, 40). Otros estudios posteriores no han podido reproducir estos resultados (41, 42). Con el avance de las técnicas de citometría y citogenética, que permiten estudios en muestra de SP, la realización de la BMO ya no es imprescindible para el diagnóstico de la LLC aunque puede aportar información relevante sobre el grado de infiltración medular (4, 6) y sigue siendo interesante evaluar su valor pronóstico real en estudios prospectivos. La figura 4 corresponde a una preparación en hematoxilina-eosina de una BMO con un patrón de infiltración difuso por LLC.

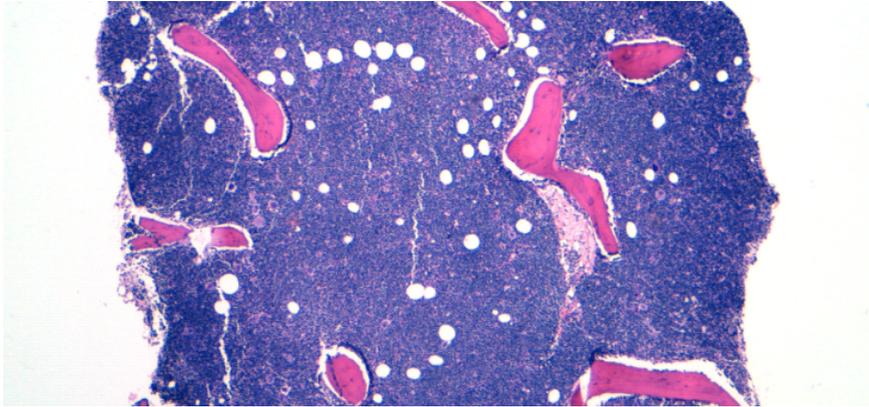


Figura 4: Preparación en hematoxilina-eosina de una BMO con un patrón de infiltración difuso por LLC.

1.2. Variables biológicas

1.2.1. Inmunofenotípicas

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico que permite la caracterización analítica y cuantitativa de células. Permite obtener información simultánea de varios parámetros celulares (tamaño, complejidad del citoplasma, antígenos y proteínas de superficie) a través de la incubación de las células con anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos y su posterior lectura y análisis por un programa informático en un citómetro. El score propuesto en los años 90 por Matutes *et al* para el diagnóstico de la LLC es el que se utiliza hasta la actualidad. Se basa en la presencia de hasta

cinco características inmunofenotípicas en la célula estudiada. Aproximadamente 90% de las LLC presentan 4 o 5 puntos en el *score* (4/5 o 5/5) (3). Los casos con puntuación 3/5 o menos tienen una baja probabilidad de tratarse de una LLC.

Tabla 5: *Score* inmunofenotípico para el diagnóstico de LLC según Matutes *et al.* La célula de la LLC debe presentar positividad para CD19 además de las características descritas en la tabla abajo. Cada una de ellas confiere 1 punto en el *score*.

Positividad para CD5
Positividad para CD23
Negatividad o expresión débil de FMC-7
Negatividad o expresión débil de inmunoglobulinas de superficie kappa o lambda
Negatividad o expresión débil de CD22/CD79b

a. CD38

Es un antígeno de membrana presente en gran variedad de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas. Funciona como molécula de adhesión celular y participa en la transducción de señales intracelulares por lo que tiene un importante papel en la supervivencia del linfocito (43, 44). A pesar de no ser útil para el diagnóstico en la LLC, se ha descrito que la coexpresión en la célula clonal de CD19 y CD38 confiere mal pronóstico a la

enfermedad, (17, 45-50). Algunos autores han descrito cambios en la expresión de CD38 a lo largo de la evolución de la enfermedad, dato que hace más interesante la realización de estudios prospectivos para determinar su valor pronóstico en muestras recogidas en el momento del diagnóstico (25, 46, 51, 52).

b. Zeta associated protein 70 (ZAP-70)

ZAP-70 es una proteína de la familia de las tirosin kinasas presente en linfocitos T y *natural killer* (NK). Se ha descrito su expresión en aproximadamente 57% de los casos de las células de LLC cuando analizada mediante citometría de flujo (53). Varios estudios retrospectivos han establecido la correlación entre la expresión de ZAP-70 y un peor pronóstico en la LLC (16, 32, 49, 50, 54), así como una posible concordancia entre la expresión de ZAP-70 y el estado mutacional de la región variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgVH) (53, 55, 56). El estado mutacional de la IgVH es uno de los factores pronósticos más fiables en la LLC (ver apartado 2.1 de esta introducción), pero su estudio no está disponible habitualmente en la práctica clínica en la mayoría de centros. ZAP-70 es un antígeno intracelular con expresión generalmente débil en la LLC, lo que hace que su determinación sea variable y poco reproducible. No hay consenso

sobre el mejor método para estudiarlo (57). También algunos autores han sugerido cambios en la expresión de ZAP-70 a lo largo de la evolución de la enfermedad (58, 59) por lo que sigue poco definido el papel pronóstico de la ZAP-70 en la LLC y es interesante estudiarlo de forma prospectiva.

1.2.2. Citogenéticas

Los linfocitos de la LLC son células en la fase G0 del ciclo celular que tienen una supervivencia prolongada por defecto de la apoptosis (60). Este hecho dificulta bastante la aplicación de las técnicas citogenéticas convencionales debido a la dificultad en obtener células en división para análisis del cariotipo, por lo que es necesaria la estimulación *in vitro* con mitógenos. Entre los pacientes a los que se puede realizar el cariotipo, aproximadamente el 55% presentan anomalías cromosómicas por citogenética convencional (61). Con la introducción de las técnicas citogenéticas de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), que permiten el análisis cromosómico de células en interfase, se han podido documentar anomalías citogenéticas en 77-82% de los pacientes con LLC (24, 62). Sin embargo, para utilizar la FISH uno “debe saber la anomalía que se busca” ya que no se obtiene el análisis de todos los cromosomas como en el cariotipo convencional.

Las alteraciones cromosómicas más frecuentemente encontradas por FISH en la LLC son: (a) delección del brazo largo del cromosoma 13 (13q-) en 55-64% de casos, (b) trisomía del cromosoma 12 (+12) en 16-25% de casos, (c) delección del brazo largo del cromosoma 11 (11q-) en 15-18% de casos, (d) delección del brazo corto del cromosoma 17 (17p-) en 7-8% de casos y (e) delección del brazo largo del cromosoma 6 (6q-) en hasta 6% de casos (24, 62).

Más de una alteración pueden coexistir en el mismo paciente, por lo que se utiliza el modelo jerárquico de cinco categorías pronósticas propuesto por Dohner *et al*, que se resume en la tabla 6. Así, una FISH sin anomalías o la presencia únicamente de 13q-se correlacionan con una mayor supervivencia. Las dos alteraciones de mal pronóstico son 11q- y 17p- (24, 62, 63). La región del cromosoma 17 donde ocurre 17p- puede afectar el gen TP53, un importante regulador del ciclo celular e inductor de la apoptosis (64), mientras 11q- incluye varios genes supresores de tumores, entre ellos ATM, que también funciona como regulador del ciclo celular activando TP53, y que puede estar mutado en hasta un tercio de pacientes con 11q- (65). La +12 sin 11q- y sin 17p- confiere un pronóstico intermedio a la enfermedad.

Tabla 6: Modelo jerárquico de cinco categorías pronosticas en LLC según análisis de FISH.*

Categoría	Frecuencia (%)	Mediana de supervivencia (meses)
17p-	7	32
11q- sin 17p-	17	79
FISH normal	18	111
+12 sin 11q- o 17p-	14	114
13q- aislada	36	133

*Modificado de Dohner *et al*

Más recientemente algunos autores han estudiado el papel pronóstico del cariotipo complejo en la LLC y se ha visto que incluso los casos con 13q- aislada por FISH presentan una evolución más desfavorable cuantas más alteraciones presenten en el cariotipo (66). También se ha descrito la presencia de anomalías en el cariotipo en hasta un 35% de aquellos pacientes que presentan una FISH normal si se estimulan las células con nuevos mitógenos, y estos casos también tienen peor pronóstico (67). Ya que muchas de estas alteraciones citogenéticas son adquiridas a lo largo de la evolución de la LLC (63, 68), es interesante evaluar su papel pronóstico al diagnóstico en los estadios precoces.

La figura 5 corresponde a un cariotipo convencional donde se observa una +12. La figura 6 muestra la presencia de 11q- en un análisis por FISH.

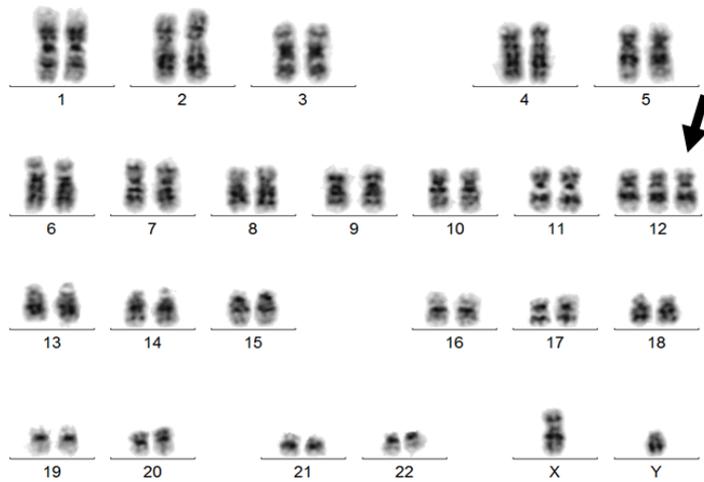


Figura 5: Trisomía del cromosoma 12 en un cariotipo convencional.

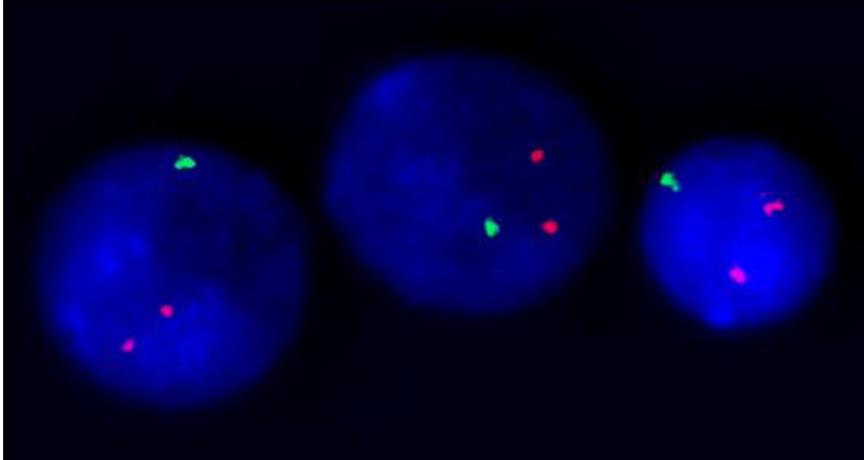


Figura 6: Delección 11q- por FISH en tres núcleos en interfase. Una señal verde significa la pérdida de uno de los alelos del gen ATM. Las dos señales rojas confirman la presencia de los dos alelos del gen TP53.

2. Factores pronósticos no fácilmente disponibles en la práctica clínica

2.1. Estado mutacional de la IgVH

Poco más de la mitad de los pacientes con LLC presenta mutaciones en la IgVH, dato que sugiere que el clon leucémico se originaría de células B maduras post germinales. Esto confiere un pronóstico más favorable (69-71). En el resto de casos las células de la enfermedad se derivarían de los linfocitos vírgenes o *naïve*

que no han pasado por el centro germinal del folículo linfoide y consecuentemente no han estado en contacto con los antígenos del mismo. Estos pacientes no presentan mutaciones en la IgVH y suelen requerir tratamiento de forma precoz, evolucionando desfavorablemente (25, 33, 52, 72). El análisis de estas mutaciones requiere técnicas caras y laboriosas por lo que aún no se realiza de forma rutinaria en muchos centros. Se ha intentado buscar la correlación entre el estado mutacional de la IgVH y otras variables pronósticas en la LLC, pero hasta el momento ninguna se puede utilizar como un fiable subrogado (53, 55, 71, 72). Se han publicado algunas propuestas de *score* pronóstico en LLC basadas en análisis retrospectivos, y el estado mutacional de la IgVH es uno de los factores que puntúa en todos ellos, sea juntamente con variables clásicas, con biológicas o con otras variables moleculares más novedosas (27, 50, 73, 74). Precisamente por la dificultad en disponer de este análisis, estos *scores* pronósticos no son utilizados en la práctica clínica de forma generalizada.

2.2. Mutaciones en otros genes

Más recientemente, a raíz de la secuenciación del genoma de la LLC, sabemos que hay algunos genes que están mutados de forma recurrente y que probablemente puedan tener valor pronóstico

(75). Así, se encuentran mutaciones de TP53, ATM, BIRC3, NOTCH1, SF3B1 y MYD88 en porcentajes variables en la LLC, y parecen correlacionarse con un curso clínico desfavorable aunque se requieren estudios prospectivos y con largo seguimiento para que se pueda determinar el valor real de esas alteraciones y su correlación con otros datos clínico-biológicos en la LLC (76-78). Su análisis tampoco está disponible en la práctica clínica diaria de la mayoría de centros.

En resumen, la naturaleza indolente pero heterogénea de la LLC hace que sean necesarios estudios prospectivos, con largo seguimiento y enfocados en los estadios iniciales de la enfermedad para buscar variables en este grupo de pacientes que se correlacionen con el pronóstico y poder así identificar el subgrupo de mayor riesgo y que podría beneficiarse de tratamiento de forma precoz. Existen muy pocos estudios en la literatura con estas características, muchos se basan en cohortes heterogéneas de pacientes con LLC en varios estadios y con muestras recogidas a lo largo de la evolución clínica de los mismos, en algunos casos incluso después de tratados. Las pocas series prospectivas que estudian factores pronósticos han dejado de lado las variables clásicas y no las analizan de forma conjunta con las biológicas, o incluyen muy a menudo variables muy nuevas no disponibles en la práctica clínica. A pesar de la

descripción más reciente de varios posibles marcadores genéticos y moleculares con valor pronóstico, sigue siendo interesante determinar el papel de variables que realmente podemos utilizar para tomar decisiones en el manejo clínico del paciente con LLC.

Por todo lo anteriormente explicado, se consideró que el análisis de los factores pronósticos en pacientes con LLC en estadios precoces y con un seguimiento prospectivo era de gran interés. Para ello, se han realizado dos trabajos que se corresponden con las dos publicaciones presentadas en este documento:

1. Estudio de los 135 pacientes diagnosticados entre 2003 y 2006 con análisis de los factores pronósticos en los pacientes con estadios precoces 0-1 de Rai.
2. Estudio de los 307 pacientes diagnosticados entre 2003 y 2010 con análisis de factores pronósticos en los pacientes con linfocitosis clonal con fenotipo de LLC sin ningún otro signo o síntoma de la enfermedad: LBM y estadios 0 de Rai.

La tabla 7 resume las variables y marcadores pronósticos analizados en el presente estudio.

Tabla 7: Factores pronósticos presentes al diagnóstico analizados en el estudio.

Factores pronósticos disponibles en la práctica clínica	Variables clásicas	Estadiaje de Rai
		Relacionadas con los linfocitos en SP: - Morfología linfocitaria - Numero de linfocitos
		Marcadores séricos: - LDH - B2M
	Patrón de infiltración en la BMO	
	Variables biológicas	Inmunofenotípicas: - CD38 - ZAP-70
		Citogenéticas: - FISH: 13q, +12, 11q-, 17p- - Cariotipo complejo

HIPÓTESIS

La mayoría de los casos de LLC presentan un comportamiento indolente y no requieren tratamiento pero un porcentaje de pacientes tienen una evolución clínica desfavorable con progresión de la enfermedad y necesidad precoz de tratamiento. En la actualidad, un número cada vez mayor de pacientes se diagnostica en fases muy tempranas de la enfermedad. La identificación de aquellos casos de mal pronóstico aun en las fases iniciales de la LLC podría permitir que se beneficiaran de tratamiento precoz y por lo tanto, cambiar el curso de la enfermedad.

Hay múltiples estudios retrospectivos en la literatura que valoran diversas variables pronosticas en la LLC. Sin embargo, en la mayoría de ellos se analizan series de pacientes en diferentes estadios de la enfermedad y muchos incluyen variables no disponibles en la práctica clínica diaria. Hay muy pocos estudios prospectivos diseñados para evaluar factores pronósticos en pacientes con estadios iniciales de la LLC.

Desde 2008 se utiliza el límite de 5×10^9 /L linfocitos B clonales en SP para separar LBM de las formas más iniciales de LLC. Muchos estudios retrospectivos sugieren que este número es arbitrario y

que el límite de linfocitos B clonales que podría tener impacto en el pronóstico podría ser más elevado.

Nuestra dos hipótesis son:

1. Existen variables clínicas y biológicas presentes en el paciente con LLC en estadio precoz que pueden ayudar a identificar un subgrupo de mal pronóstico. Algunas de estas variables son fácilmente analizables y disponibles en la práctica clínica diaria.
2. El número de linfocitos B clonales al diagnóstico utilizado actualmente para definir LBM y LLC puede no tener un real impacto en el pronóstico y por lo tanto, no ser el más adecuado para separar las dos formas clínicas de la enfermedad.

Para analizar ambas hipótesis, hemos realizado un estudio prospectivo de los pacientes diagnosticados de neoplasias con fenotipo de LLC en nuestro centro con un largo seguimiento y centrado en los estadios precoces de la enfermedad.

OBJETIVOS

1. Valorar de forma prospectiva que variables presentes en el momento del diagnóstico tienen valor pronóstico sobre la evolución posterior de la LLC en pacientes en estadios precoces.
2. Valorar de forma prospectiva que variables presentes en el momento del diagnóstico tienen valor pronóstico en pacientes con linfocitosis B clonal con fenotipo de LLC sin otros síntomas o signos de enfermedad.
3. Identificar qué número de linfocitos B clonales al diagnóstico permite diferenciar los pacientes con linfocitosis B clonal con fenotipo de LLC y sin otros síntomas o signos de enfermedad en dos grupos con diferentes comportamientos clínicos.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. Identificación de pacientes y recogida de datos clínicos

La identificación de los casos se hizo a través del hemograma que se realiza de forma rutinaria a todos los pacientes que se visitan por primera vez en el Servicio de Hematología Clínica del ICO-HDiR o a través de las biopsias ganglionares remitidas al Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari de Bellvitge (HUB). En el estudio se incluyeron de forma prospectiva todos los pacientes en los que se detectó una población de linfocitos con fenotipo compatible con LLC y/o una biopsia ganglionar compatible con LLP en el Servicio de Hematología Clínica del ICO-HDiR desde enero de 2003 a diciembre de 2010 y que al menos acudieron a una segunda visita en el centro (n=307). Una vez identificados, en la primera visita se recogieron los datos demográficos, clínicos y de laboratorio al momento de diagnóstico y se introdujeron en una base de datos que se actualizó periódicamente durante el seguimiento prospectivo con datos evolutivos principalmente relacionados con la progresión de la enfermedad, inicio de tratamiento o exitus. El tratamiento se inició en el momento en que el paciente presentaba criterios para ello (4, 6).

El estudio fue aprobado por el comité ético del hospital, los pacientes fueron informados de la participación en él y firmaron la hoja de consentimiento informado.

Se han realizado 2 estudios. En el primer trabajo se analizaron los pacientes diagnosticados de LLC entre los años 2003 y 2006, y en el segundo se analizaron los pacientes diagnosticados entre 2003 y 2010.

El diagnóstico de LLC se hizo según las guías de la NCI de 1996 (6) para el trabajo 1 y de 2008 (4) para el trabajo 2. En este trabajo, los casos diagnosticados antes de 2008 fueron retrospectivamente reclasificados según las guías del mismo año.

Al diagnóstico, todos los pacientes fueron estadiados según los esquemas clásicos de Rai y Binet. La valoración de la presencia de adenopatías o visceromegalias se hizo por exploración física. La BMO no se realizó de forma obligatoria.

2. Definiciones

- Progresión de la enfermedad: cambio a un estadio superior de Rai o Binet o aparición de criterios de enfermedad activa según las guías de la NCI no presentes en la visita previa (tabla 1) (4, 6).
- Supervivencia libre de progresión (SLP): tiempo entre el diagnóstico y el primer signo de progresión de la enfermedad.
- Supervivencia libre de tratamiento (SLT): tiempo entre el diagnóstico y el primer tratamiento administrado.
- Supervivencia global (SG): tiempo entre el diagnóstico de la enfermedad y el exitus.

3. Recogida de muestras

Se recogieron muestras de SP de todos los pacientes y en algunos casos también de MO al diagnóstico. Se analizaron en el Laboratorio de Citología Hematológica del HUB, donde se realizó hemograma, morfología de los linfocitos, recuento de linfocitos B monoclonales por citometría de flujo e inmunofenotipo completo de los linfocitos incluyendo CD38 y ZAP-70. La morfología linfocitaria se evaluó en todos los casos siempre por los mismos dos o tres expertos y de acuerdo con la clasificación de la FAB (11).

El análisis de LDH y B2M se hizo en el Laboratorio de Bioquímica del HUB. Los casos con muestra de BMO y/o biopsia ganglionar se estudiaron en el Laboratorio de Anatomía Patológica del HUB.

Finalmente, el estudio del cariotipo y de las alteraciones citogenéticas por FISH se hizo en los Laboratorios de Citogenética del Hospital de Mar hasta 2005 y del Hospital Germans Trias i Pujol a partir de 2005.

4. Procesamiento de las muestras

4.1. Estudio inmunofenotípico por citometría de flujo

Se trabajó con muestras de SP anticoaguladas con EDTA. La preparación de la muestra se realizó por la técnica estándar, incubando la misma con los distintos anticuerpos monoclonales. Se hicieron triples marcajes combinando los tres fluorocromos FITC, PE y Percp mediante técnica directa, salvo el ZAP-70 que se hizo por técnica indirecta. Se utilizó un control de fluorescencia (IgG1/IgG2, Dako).

Las células sanguíneas fueron procesadas por el citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson) y estudiadas con los programas CellQuest y Paint-a-gate. La máquina realizó la adquisición de

10.000 eventos (células) sobre la ventana de linfocitos y se analizaron los distintos anticuerpos monoclonales aislando las células CD19 positivas. Se consideró positividad para un anticuerpo monoclonal cuando presente en más de 20% de la población celular (30% en el caso del CD38) y se valoró la intensidad del mismo según su disposición en log1 (débil), log2 (media) y log3 (intensa). La tabla 8 resume el protocolo de estudio inmunofenotípico de la LLC. Sobre la ventana de células CD19 positivas, se analizaron las distintas combinaciones de anticuerpos.

Tabla 8: Protocolo de estudio inmunofenotípico de LLC.

CD5/CD23/CD19
CD5/CD23/CD19
FMC-7/CD79b/CD19
CD20/CD54/CD19
CD5/CD38/CD19
CD25/CD11c/CD19
CD103/IgD/CD19
IgM/CD19
CD27/CD19
CD10/CD19
Kappa/Lambda/CD19
CD3/ZAP-70/CD19 (técnica indirecta)

4.2. Citogenética convencional

Los estudios citogenéticos en SP se realizaron mediante incubación de las células durante 72h en un medio de cultivo con 75% de RPMI 1640, 2.5% de antibiotico, 2.5% de L-glutamina, 20% de suero fetal además de TPA (forbol 12-miristato 13-acetato), un mitógeno específico para linfocitos de línea B. Después de la incubación, se añadió el antimitótico Colcemid, con finalidad de interrumpir la división celular, y posteriormente se hizo tratamiento hipotónico durante 25-30 minutos a 37°C para obtener la separación de los cromosomas. Se realizó la fijación de los mismos con el fijador Carnoy y se realizaron extensiones celulares que se introdujeron en cámara caliente a 100°C durante una hora y posteriormente se tiñeron con solución de Wright. Se analizaron como mínimo 20 metafases por caso. El cariotipo se describió según la nomenclatura ISCN (79). Para el análisis posterior de los datos, los cariotipos se clasificaron en normal, anormal no complejo o anormal complejo (tres o más anomalías) (80).

4.3. Técnica de FISH

Sobre los frotis fijados se aplicaron las sondas de DNA específicas para las cuatro alteraciones más frecuentes en la LLC: la sonda centromérica del cromosoma 12, la sonda para 13q14 (D13S319), para 17p13/p53 y para 11q/ATM. Los frotis se incubaron a 37°C durante una noche y a oscuras. Posteriormente se contra tiñeron con 4'6-diamino-2-fenilindol (DAPI-II) y se analizaron con un microscopio de fluorescencia. Se contaron 200 núcleos y se reportó el porcentaje de células positivas. Se consideró positividad para +12 cuando la alteración estuvo presente en más de 5% de los núcleos analizados. Para las otras tres anomalías el *cut-off* de positividad fue el 10%. Los resultados de la FISH también se informaron según la nomenclatura ISCN. Para el análisis posterior, estos resultados se agruparon en las categorías descritas según Dohner *et al*: (1) FISH normal, (2) presencia de 13q- aislada, (3) presencia de +12 sin 11q- o 17p-, (4) presencia de 11q- sin 17p- y (5) presencia de 17p- con o sin otras anomalías (24).

5. Análisis estadístico

Las características clínico-biológicas de los pacientes se analizaron de forma descriptiva. Para contrastar la relación entre las variables se utilizaron las tablas de contingencia y el test de Chi-cuadrado. Las curvas de supervivencia se estimaron con el método de Kaplan Meier. Con el test de log-rank se analizaron las diferencias de supervivencia entre subgrupos. El análisis multivariante de supervivencia se realizó con el modelo de regresión de Cox.

Para identificar el límite óptimo de linfocitos B clonales en relación a SLP y SLT se evaluó el riesgo de cada aumento de 1×10^9 /L linfocitos, empezando desde un recuento de 1×10^9 /L linfocitos B clonales al diagnóstico hasta 20×10^9 /L y para eso se calcularon las curvas ROC (81).

Todo el análisis se hizo con un intervalo de confianza de 95% y se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con un valor de $p < 0.05$. El paquete estadístico utilizado en el estudio fue el SPSS versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

1. Trabajo 1 – Correspondiente al primer artículo publicado:

ORIGINAL ARTICLE: CLINICAL

Prospective study of clinical and biological prognostic factors at diagnosis in patients with early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia

ANA C. OLIVEIRA¹, ESMERALDA DE LA BANDA², EVA DOMINGO-DOMENECH¹,
MAITE ENCUESTRA³, SANTIAGO MERCADAL¹, ALICIA DOMINGO²,
ESTHER ALONSO², BLANCA ESPINET⁴, JAVIER GRAU⁵,
ALBERTO FERNANDEZ DE SEVILLA¹, & EVA GONZALEZ-BARCA¹

Leukemia & Lymphoma, 2011;52(3):429-35

Se identificaron 135 pacientes diagnosticados de LLC entre enero de 2003 y junio de 2006. Se realizó un seguimiento prospectivo con una mediana de seguimiento de 39 meses.

1.1. Datos clínicos y biológicos al diagnóstico

Las tablas 9 y 10 muestran los datos clínicos y de laboratorio de los pacientes en el momento del diagnóstico.

Tabla 9: Características clínicas al diagnóstico en 135 pacientes.

	n	%
Sexo masculino	88	65.2
Edad (años)	Mediana 67	Limites 28-94
Estadio Rai		
0	89	65.9
1	25	18.5
2	16	11.9
3	3	2.2
4	2	1.5
Binet		
A	108	80
B	24	17.8
C	3	2.2
Enfermedad voluminosa	8	5.8
Esplenomegalia	16	11.9
Hepatomegalia	6	4.4
Adenopatías	39	28.9
Síntomas B	6	4.5
Morfología atípica	51	37.8
B2M elevada	43/98	43.9
LDH elevada	26/133	19.5
Proteína monoclonal	15/131	11.5
Patrón difuso en BMO	11 / 77	14.3

Tabla 10: Características inmunofenotípicas y citogenéticas al diagnóstico en 135 pacientes.

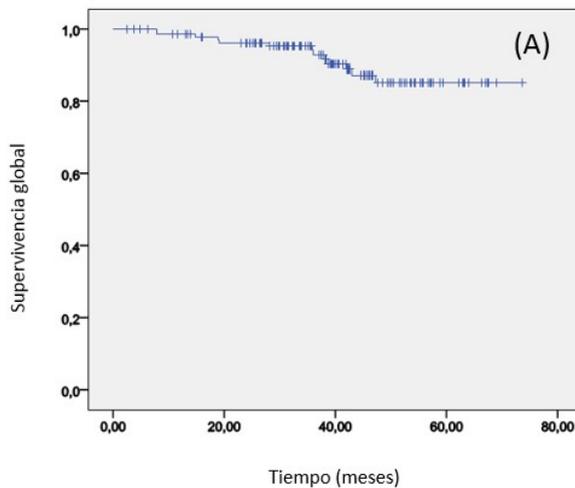
Inmunofenotipo	n	%
CD38	42/133	31.6
ZAP-70	47/131	35.9
FISH	n	%
Normal	41/ 129	31.3
13q- aislada	50/ 129	38.5
+12 sin 11q- o 17p-	16/ 129	14.8
11q- sin 17p-	11/ 129	8.5
17p-	11/ 129	8.4
Cariotipo	n	%
Normal	68/ 98	69.4
Anormal	20/ 98	20.4
Anormal complejo	5/ 98	5.1
Sin metafases	5/ 98	5.1

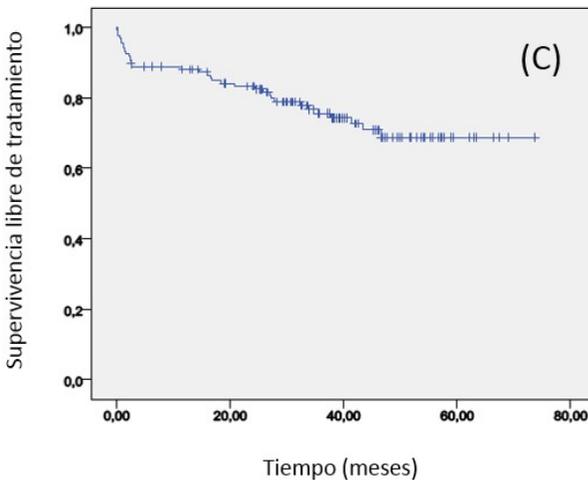
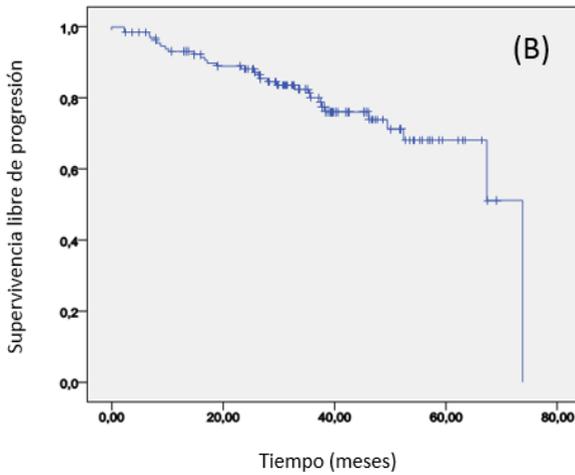
La mediana de linfocitos absolutos fue de $7.6 \times 10^9/L$ (límites 2.1 – 127.3). Quince pacientes tenían menos de $5 \times 10^9/L$ linfocitos al diagnóstico pero 13 de ellos presentaban más de 30% de infiltración medular por linfocitos de LLC y los otros dos, además de tener adenopatías al diagnóstico, desarrollaron linfocitosis superior a $5 \times 10^9/L$ a los 6 meses de entrar en el estudio, de forma que los 15 se clasificaron como LLC y no LLP (6).

1.2. Análisis de supervivencia y estudio de los factores pronósticos

Con una mediana de seguimiento de 39 meses, 13 (9.6%) pacientes fallecieron, (cinco [3.7%] de ellos por progresión de la LLC), 31 (22.9%) pacientes presentaron progresión de la enfermedad y 34 (25.2%) necesitaron tratamiento, 14 (10.4%) de ellos en el momento del diagnóstico. La figura 7 muestra las curvas de Kaplan Meier de los 135 pacientes para SG, SLP y SLT.

Figura 7: Curvas de Kaplan Meier para 135 pacientes: (A) SG, (B) SLP y (C) SLT.





Se realizó el análisis de los factores pronósticos al diagnóstico en los 114 pacientes con estadios iniciales de la LLC (Rai 0-1). Como solo siete pacientes necesitaron tratamiento a lo largo del seguimiento, no se estudiaron factores pronósticos para SLT. Veinte y cuatro (21.1%) pacientes presentaron progresión de la

enfermedad en algún momento del estudio. La tabla 11 muestra los resultados del análisis univariante para SLP en 114 pacientes.

Tabla 11: Análisis univariante de factores pronósticos al diagnóstico para SLP en 114 pacientes con LLC Rai 0-1.

Variables clásicas	n (%)	SLP
		<i>p</i>
Adenopatías	25 (21.9)	<0.001
Morfología atípica	38 (33.3)	0.001
LDH elevada	17 (15.2)	0.67
B2M elevada	30 (36.6)	0.02
Patrón difuso de la BMO	4 (6.9)	0.14
Variables biológicas	n (%)	<i>p</i>
CD38 positivo	36 (31.9)	<0.001
ZAP-70 positivo	36 (32.7)	0.005
FISH normal	36 (32.7)	0.10
13q- aislada	39 (35.8)	0.30
17p-	8 (7.3)	0.05
11q- sin 17p-	10 (9.3)	0.004
+12 sin 11q- o 17p	15 (14)	0.84
Cariotipo anormal	25 (30.4)	0.04

En el análisis multivariante para SLP se incluyeron las variables con significación estadística en el análisis univariante: presencia de adenopatías, morfología atípica, CD38, ZAP-70, 17p-, 11q- y cariotipo anormal. Solo disponíamos de niveles séricos de B2M en 82 (71.9%) pacientes por lo que esta variable fue excluida del análisis.

El único factor pronóstico significativo en el análisis multivariante para SLP en los pacientes con LLC Rai 0-1 fue la presencia de adenopatías al diagnóstico (*odds ratio* [OR] 7, intervalo de confianza [IC] 95% 2.2-22).

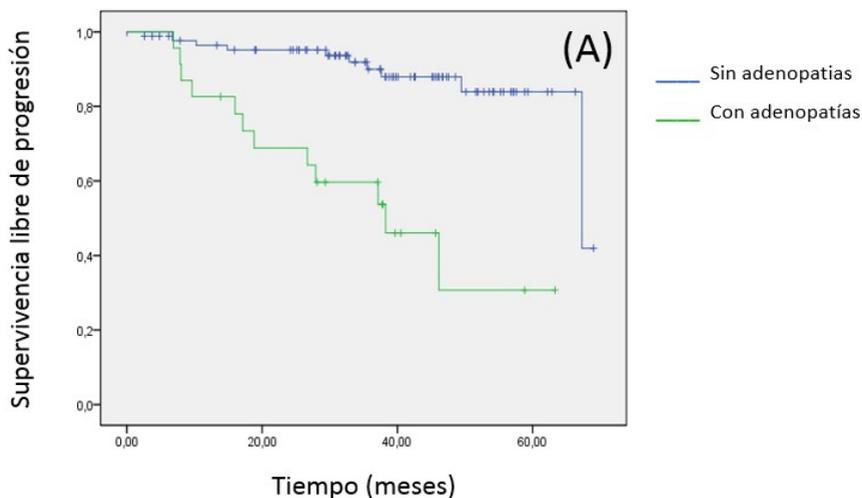
Cuando realizamos el análisis multivariante con las variables biológicas significativas del análisis univariante, la expresión de CD38 se correlacionó con una peor SLP y la presencia de 17p- casi alcanzó significación estadística (tabla 12).

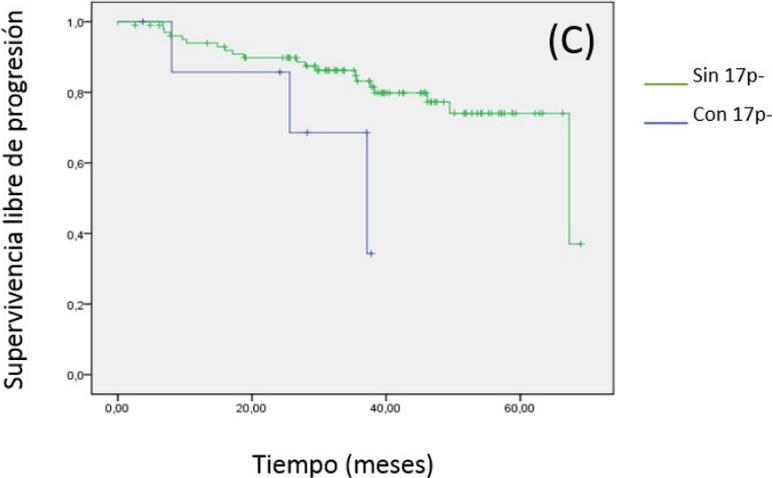
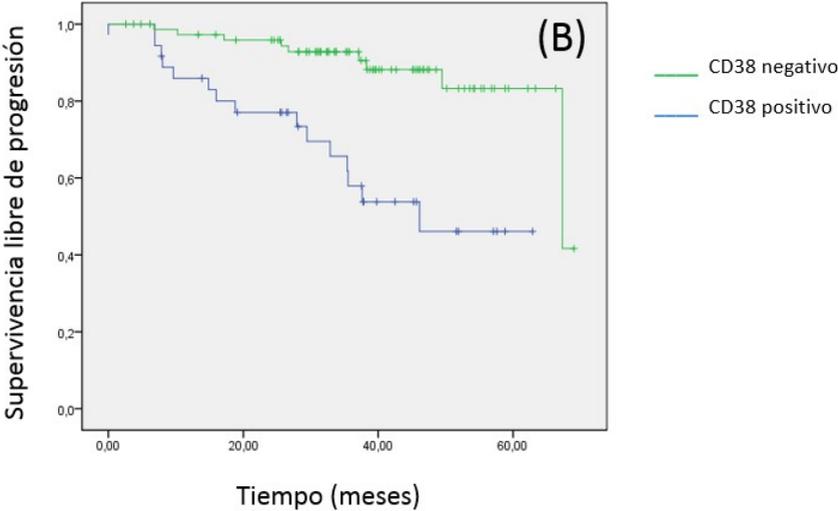
La figura 8 muestra la SLP de los 114 pacientes con estadios 0-1 de Rai en función de la presencia de adenopatías, la positividad para CD38 y la presencia de 17p- al diagnóstico.

Tabla 12: Análisis multivariante de factores pronósticos biológicos al diagnóstico para SLP en 114 pacientes con LLC Rai 0-1.

Variable biológica	<i>p</i>	OR	IC
CD38	0.03	3.2	1.1-9.3
ZAP-70	0.34	-	-
17p-	0.05	3.5	0.95-13.1
11q-	0.26	-	-
Cariotipo anormal	0.535	-	-

Figura 8: Curvas de Kaplan Meier para SLP en 114 pacientes con estadios 0-1 de Rai en función de: (A) presencia de adenopatías al diagnóstico ($p<0.001$), (B) positividad para CD38 al diagnóstico ($p<0.001$) y (C) presencia de 17p- al diagnóstico ($p=0.05$).





ORIGINAL ARTICLE: CLINICAL

Prospective study of clinical and biological prognostic factors at diagnosis in patients with early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia

ANA C. OLIVEIRA¹, ESMERALDA DE LA BANDA², EVA DOMINGO-DOMENECH¹,
MAITE ENCUESTRA³, SANTIAGO MERCADAL¹, ALICIA DOMINGO²,
ESTHER ALONSO², BLANCA ESPINET⁴, JAVIER GRAU⁵,
ALBERTO FERNANDEZ DE SEVILLA¹, & EVA GONZALEZ-BARCA¹

¹Servei d'Hematologia Clínica, Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals, IDIBELL, Hospitalet, Barcelona, Spain, ²Servei d'Hematologia, IDIBELL, Hospital de Bellvitge, Hospitalet, Barcelona, Spain, ³Unitat d'Investigació Clínica, Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals, Hospitalet, Barcelona, Spain, ⁴Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, and ⁵Servei d'Hematologia, Institut Català d'Oncologia – Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

(Received 28 October 2010; revised 28 November 2010; accepted 30 November 2010)

Abstract

Retrospective series have reported many clinical and biological significant prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia (CLL). We describe a prospective cohort of 135 patients with CLL homogeneously studied at diagnosis for prognostic factors. Biological variables analyzed were CD38 and ZAP-70 expression, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for 13q–, +12, 11q–, and 17p–, and conventional cytogenetics. Univariate and multivariate analysis for progression-free survival (PFS) were performed in patients with early stage (Rai 0–1) CLL. CD38 was positive in 42 (31.6%) patients and ZAP-70 in 47 (35.9%). The most frequent FISH finding was isolated 13q– in 50 (38.5%) patients, and 17p– was found in 11 (8.4%). Among 135 patients, 114 (84.4%) were Rai 0–1 at diagnosis and 39 (28.9%) presented adenopathies. With a median follow-up of 39 months, the presence of lymphadenopathy in patients with Rai 0–1 stage CLL was the only significant variable for predicting PFS in multivariate analysis (odds ratio [OR] 7, 95% confidence interval [CI] 2.2–22, $p = 0.001$). When only biological factors were analyzed, CD38 expression (OR 3.2, 95% CI 1.1–9.3, $p = 0.03$) and 17p– (OR 3.5, 95% CI 0.95–13.1, $p = 0.05$) correlated with worse PFS. A longer follow-up is necessary to analyze the prognostic value of these variables regarding overall survival.

Keywords: Prospective, prognostic factors, early stage, CLL

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a heterogeneous disease in which two groups of patients can be set apart: the first group shows a longer survival and no treatment requirement, while the latter presents a rapidly progressive disease and early need for treatment. The Rai [1] and Binet [2] clinical staging systems clearly separate patients with early stage disease from those with advanced disease

but are not capable of predicting, at the time of diagnosis, which patients will progress and require treatment rapidly.

Many prognostic markers, both classic and novel, have been extensively described in retrospective studies. Among the classic markers, an atypical lymphocyte morphology seems to be related to an aggressive clinical course of the disease [3,4]. Other classic variables associated with a poor prognosis in retrospective series are elevated lactate dehydrogen-

Correspondence: Ana Carla Oliveira, Servei d'Hematologia Clínica, Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals, Gran Via Km 2.7, Hospitalet, Barcelona, Spain. Tel: +34-93-260-7750. Fax: +34-93-260-7353. E-mail: acoliveira@iconcologia.net

ase (LDH) and β_2 -microglobulin (B2M) [5,6], as well as a diffuse bone marrow infiltration pattern [7].

The biological prognostic markers mostly studied and available for clinical practice are the expression of CD38 and ZAP-70 in CLL lymphocytes detected by flow cytometry and the chromosomal abnormalities seen by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Expression of CD38 has been associated with shorter overall survival (OS) and treatment-free survival (TFS) in many retrospective studies [4,8–10]. Some studies also report that CD38 expression may vary through the course of the disease from positive to negative and vice versa [9,11]. It is thus very important to validate its prognostic value in prospective series and determine CD38 expression at diagnosis. Zeta associated protein (ZAP-70) is described as a surrogate for the mutational status of the immunoglobulin heavy chain (IGVH) gene [12], one of the strongest predictors of survival in CLL. This makes the protein a very interesting marker, as the IGVH gene sequencing assay is difficult to perform in a routine laboratory, being unavailable for most centers. Some studies report that the simultaneous presence of both CD38 and ZAP-70 is associated with a worse prognosis [13,14].

Cytogenetic studies using FISH have contributed to identifying current abnormalities in patients with CLL and stratifying them into separate prognostic groups. Dohner *et al.* [15] defined a hierarchical survival model to assign patients to risk categories according to FISH findings in a retrospective study. Patients with 17p or 11q deletion (17p– and 11q–, respectively) seem to have a shorter survival period and a shorter treatment-free interval. These two abnormalities were also associated with more advanced disease and poor response to treatment [16,17]. It is important to remark, however, that clonal evolution occurs in CLL, and chromosomal abnormalities can be acquired in untreated patients during the course of the disease [18,19]. This, again, makes prospective studies necessary to confirm the prognostic value of FISH abnormalities in samples collected at the time of diagnosis.

Our study describes a cohort of 135 consecutive patients newly diagnosed with CLL and studied homogeneously at our hospital. We analyzed classic and biological prognostic factors at the time of diagnosis in 114 patients with Rai 0–1 CLL and their impact on progression-free survival (PFS) during a prospective follow-up.

Design and methods

One hundred and thirty-five consecutive patients diagnosed with CLL in a single institution between

January 2003 and June 2006 were included in this study. Patients read and signed a written informed consent. Diagnosis of CLL was made in peripheral blood and/or bone marrow samples and/or nodal tissue according to National Cancer Institute (NCI) 1996 CLL Working Group criteria [20].

Complete clinical data were reported at the time of diagnosis, including disease stage according to Rai and Binet systems. Adenopathies were described by physical examination, since diagnostic imaging techniques were not mandatory. All patients were classified as having typical or atypical CLL according to lymphocyte morphology [21]. Although also not mandatory, for those cases in which bone marrow biopsy was performed, the infiltration pattern was evaluated as diffuse or non-diffuse [7]. Biological variables analyzed included peripheral blood lymphocyte morphology and flow cytometry immunophenotype, conventional karyotype, and FISH analysis. Mutational status of the IGVH gene was not available in this study.

Patients were prospectively followed for progression, treatment requirement, or death, at least once every 6 months until December 2008. Progression was defined as change to a higher Rai stage or the onset of active disease according to NCI treatment criteria [20] not present at the previous medical visit. PFS was considered the time between diagnosis and the first sign of disease progression, and TFS was defined as the time from diagnosis until the first treatment was required.

Immunophenotypic study

Immunophenotypic study of B-lymphocytes in blood samples was performed using a Becton Dickinson FACScan flow cytometer, as previously described [10]. The following antibody–fluorochrome combinations were used: fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled antiCD5 (clone L17F12), phycoerythrin (PE)-labeled antiCD23 (clone EBVCS-5), peridinin-chlorophyll protein (PerCP)–Cy5.5-labeled antiCD19 (clone SJ25C1), PE-labeled antiCD38 (clone HB7) (all the above from Becton Dickinson [BD], Franklin Lakes, NJ, USA), PE-labeled antiCD79B (clone CB3-1; Beckman Coulter, Brea, CA, USA), FITC-labeled antiFMC7 (clone FMC7; DAKO, Glostrup, Denmark), antiZAP-70 (clone 1E7.2, Alexa Fluor 488; Calcat Laboratories, Burlingame, CA, USA), and restriction surface light chains anti- κ -FITC (clone TB28-2; BD) and anti- λ -PE (clone 1-155-2; BD).

ZAP-70 analysis was performed using flow cytometric assay as follows. Cells were incubated with CD19-PE (clone 4G7) for 10 min in the dark at room temperature; cell pellets were resuspended,

fixed, and permeabilized (Fix & Perm Kit; DakoCytomation, Glostrup, Denmark). The permeabilized cells were incubated with ZAP-70 fluorescein isothiocyanate (clone 1E7.2, Alexa Fluor 488; Caltag Laboratories) for 15 min in the dark at room temperature, and thereafter cells were washed and acquired in the flow cytometer. ZAP-70 levels were expressed as the percentage of positive events in relation to the isotype control (immunoglobulin G1 [IgG1] Alexa Fluor 488 conjugate; Caltag Laboratories) [22].

Data were analyzed with CellQuest and Paint-A-Gate programs. CD19-positive cells were gated and studied according to the Royal Marsden Score system [23] in all cases for the abovementioned markers. Positivity was considered when at least 20% of pathologic lymphocytes expressed a particular antibody [12], except for CD38, which was considered positive above 30% [8,10].

Conventional cytogenetics and FISH

Conventional cytogenetic studies were performed in peripheral blood from 24 h cultures, and karyotypes were described according to the ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature), 1995 [24].

Standard interphase FISH was performed in blood sample cells. Vysis centromeric probe for chromosome 12 and locus specific probes for 13q14, 17p13, and 11q22 deletions were employed (Vysis CLL Probe Panel, including Probe Set 1 LSI ATM/LSI p53 and Probe Set 2 CEP 12/LSI D13S319/LSI 13q34). Two hundred nuclei were analyzed for each probe.

FISH results were divided into the five hierarchical categories classically proposed [15]: (1) normal FISH; (2) presence of isolated 13q deletion (13q-); (3) presence of 17p- with or without other abnormality; (4) presence of 11q- with or without other abnormality but 17p-; and (5) presence of 12 trisomy (+12) alone or with 13q-.

Statistical analysis

Main characteristics of patients including biological data are shown descriptively. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method and the log-rank test was used to identify differences in survival between subgroups. Multivariate analysis for survival was performed with a Cox regression model. All analyses were performed at a 95% confidence level and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Statistical analysis was done using SPSS software, version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Table I. Clinical features at diagnosis in 135 patients.

	n	%
Male gender	88	65.2
Age (years)	Median age 67	Limits 28-94
Staging		
Rai		
0	89	65.9
1	25	18.5
2	16	11.9
3	3	2.2
4	2	1.5
Binet		
A	108	80
B	24	17.8
C	3	2.2
Bulky disease	8	5.8
Splenomegaly	16	11.9
Hepatomegaly	6	4.4
Adenopathy	39	28.9
B symptoms	6	4.5
Atypical morphology	51	37.8
Elevated B2M	43/98	43.9
Elevated LDH	26/133	19.5
Monoclonal protein	15/131	11.5
Diffuse BM pattern	11/77	14.3

B2M, β_2 -microglobulin; LDH, lactate dehydrogenase; BM, bone marrow.

Table II. Biological features at diagnosis in 135 patients.

Immunophenotype		
CD38	42/133	31.6
ZAP-70	47/131	35.9
FISH		
Normal	41/129	31.3
Isolated 13q-	50/129	38.5
+12, not 11q- or 17p-	16/129	14.8
11q-, not 17p-	11/129	8.5
17p-	11/129	8.4
Karyotype		
Normal	68/98	69.4
Abnormal	20/98	20.4
Abnormal complex	5/98	5.1
No metaphases	5/98	5.1

FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

Results

Clinical and biological data at diagnosis

One hundred and thirty-five patients diagnosed with CLL were analyzed. Clinical and biological data at diagnosis are summarized in Tables I and II.

The median absolute lymphocyte count at diagnosis was 7.6×10^9 cells/mm³ (range 2.1-127.3). Fifteen patients had fewer than 5×10^9 lymphocytes in peripheral blood at diagnosis, although 13 of them presented more than 30% of CLL

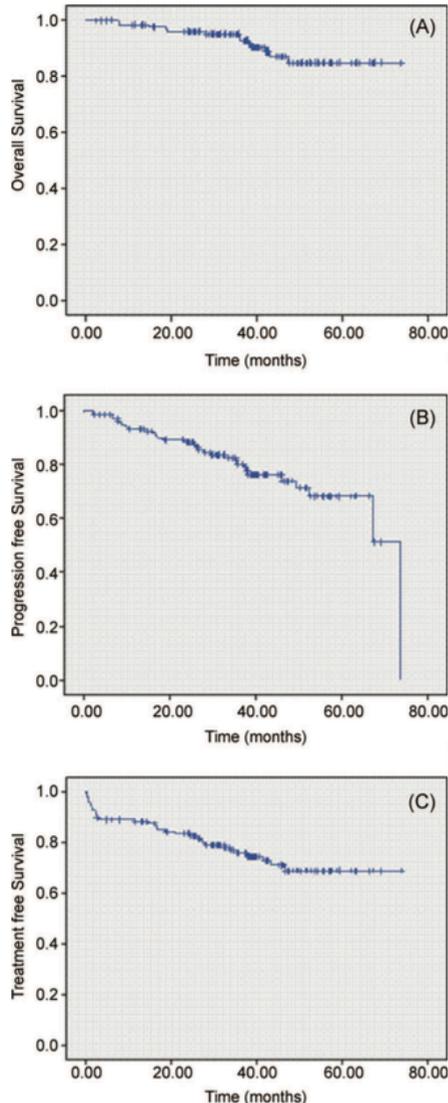


Figure 1. Kaplan-Meier curves for 135 patients: (A) OS curve (OS=85% with a median follow-up of 39 months); (B) PFS curve; (C) TFS curve (TFS=68%).

lymphocytes at bone marrow examination. The other two patients had lymphadenopathy at diagnosis, and were enrolled in the study at 6 months from diagnosis when increasing lymphocytosis reached 5×10^9 cells/mm³.

Table III. Univariate analysis of prognostic factors at diagnosis for PFS in patients with Rai 0-1 CLL ($n=114$).

	<i>n</i> (%)	<i>p</i> -Value
Classical prognostic markers		
Adenopathy	25 (21.9)	0.000
Atypical morphology	38 (33.3)	0.001
Elevated LDH	17 (15.2)	0.67
Elevated B2M	30 (36.6)	0.02
Diffuse BM pattern	4 (6.9)	0.14
Biological prognostic markers		
Positive CD38	36 (31.9)	0.000
Positive ZAP-70	36 (32.7)	0.005
Normal FISH	36 (32.7)	0.10
Isolated 13q-	39 (35.8)	0.30
17p-	8 (7.3)	0.05
11q-, not 17p-	10 (9.3)	0.004
+12, not 11q- or 17p-	15 (14)	0.84
Abnormal karyotype	25 (30.4)	0.04

PFS, progression-free survival; LDH, lactate dehydrogenase; B2M, β_2 -microglobulin; BM, bone marrow; FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

Survival analysis and study of prognostic factors

Kaplan-Meier curves for OS, PFS, and TFS of the 135 patients with CLL are shown in Figures 1(A), 1(B), and 1(C), respectively.

With a median follow-up of 39 months, 13 (9.6%) patients died, five of them from CLL progression. Thirty-one (22.9%) patients presented disease progression. A total of 34 (25.2%) patients received treatment, 14 (10.4%) of them at the time of diagnosis.

Analysis of prognostic factors at diagnosis was performed for patients with Rai 0-1 CLL ($n=114$). As only seven patients in this group required treatment during the follow-up period, prognostic factors for TFS were not analyzed. Results of the univariate analysis for PFS of 114 patients are summarized in Table III.

Variables included in the multivariate analysis were: lymphadenopathy, atypical morphology, CD38, ZAP-70, 17p-, 11q-, and abnormal karyotype. Since B2M serum levels were measured in only 82 (71.9%) of all patients with Rai stage 0-1 disease, this was excluded from the multivariate analysis. The presence of lymphadenopathy at diagnosis was the only significant prognostic factor for PFS in patients with Rai stage 0-1 CLL (odds ratio [OR] 7, 95% confidence interval [CI] 2.2-22) ($p=0.001$). The corresponding Kaplan-Meier curve is shown in Figure 2(A).

Table IV summarizes the results of multivariate analysis performed only with those biological variables that were significant in the univariate analysis (CD38, ZAP-70, 17p-, 11q-, and abnormal

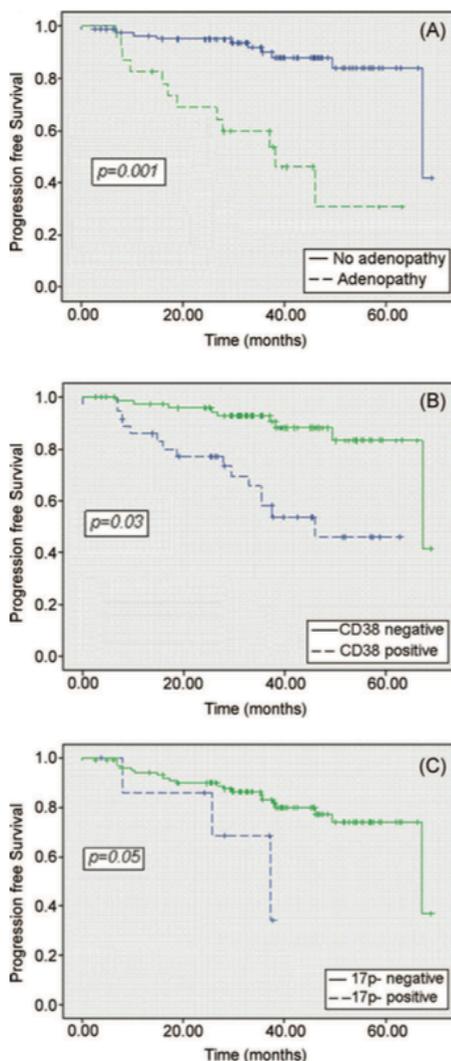


Figure 2. Kaplan-Meier PFS curves for 114 patients with early Rai stage: (A) according to the presence of adenopathy at diagnosis; (B) according to CD38 expression at diagnosis; (C) according to the presence of 17p- at diagnosis.

karyotype). CD38 expression was significantly associated with worse PFS, and 17p- almost reached statistical significance. Kaplan-Meier curves for PFS of patients with CLL Rai 0-1 according to CD38 expression and 17p- at diagnosis are shown in Figures 2(B) and 2(C).

Table IV. Multivariate analysis for biological prognostic factors at diagnosis for PFS in patients with Rai 0-1 CLL ($n=114$)*.

Biological variable	p-Value	OR	95% CI
CD38	0.03	3.2	1.1-9.3
ZAP-70	0.34	-	-
17p-	0.05	3.5	0.95-13.1
11q-	0.26	-	-
Abnormal karyotype	0.535	-	-

*Total number of valid events to perform analysis: 100.

PFS, progression-free survival; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Discussion

We describe a prospective series of 135 newly diagnosed patients with CLL studied homogeneously at the time of diagnosis. Prognostic factors for PFS in 114 patients with early stage (Rai 0-1) CLL are presented. To our knowledge, there are only two previous prospective studies in the literature that analyzed biological prognostic factors in CLL cohorts [19,25], and our series is the first in which these variables have been studied separately in the group of patients with early stage CLL, in whom prognostic information is certainly required.

The presence of lymphadenopathy by physical examination at diagnosis was the only significant prognostic factor for progression in patients with early stage CLL. This classic variable showed even more significance in multivariate Cox regression analysis compared with any of the other biological variables analyzed, such as immunophenotype and FISH findings. In a previous retrospective study by Muntañola *et al.* [26], with a median follow-up of 61 months, the authors reported that even lymphadenopathy found by computed tomography (CT) scan performed at diagnosis in patients with Rai 0 CLL strongly correlated with disease progression (relative risk of 2.71). These authors considered a CT scan to be abnormal when one or more anomalous lymph node regions were observed, including spleen enlargement. Our prospective series highlights the importance of an easily available tool as physical examination for lymphadenopathy in predicting progression in patients with early stage CLL.

When we excluded classic prognostic factors and analyzed only biological variables in patients with early stage CLL, CD38 expression became the most important prognostic factor in our series. Hus *et al.* [25] studied CD38 prognostic value in a prospective cohort of 217 consecutive patients with CLL, 50 with Rai stage 0 and 115 with Rai stage 1-2, and confirmed CD38 expression as an independent prognostic factor in multivariate analysis (hazard ratio 1.03, $p=0.002$). In a previous retrospective

study by Del Poeta *et al.* [27], CD38 expression by flow cytometry with a cut-off of 30% was correlated with a shorter PFS in mostly Rai 0 ($n=45$) and Rai 1–2 ($n=116$) stages (37% for CD38-positive vs. 75% for CD38-negative patients at 5 years, $p=0.000$). Many other retrospective studies described the prognostic value of CD38 expression in predicting survival [10,28–31]. Several authors also reported changes in CD38 status through the course of the disease [9,11,28,29], which makes our results about the prognostic value of CD38 expression at diagnosis even more interesting.

Deletion of 17p by FISH almost reached statistical significance for PFS in our series ($p=0.05$). Previous retrospective series described the correlation between 17p– and a shorter PFS [4,15,17]. To our knowledge, there is only one prospective study in the literature that analyzed the prognostic value of chromosomal abnormalities in patients with CLL [19]. Although a cohort of 159 patients was described, only 96 were enrolled on the study less than 1 year from diagnosis. With a median follow-up time of 8.4 years, authors analyzed mostly patients with early Rai stage (83% of all analyzed patients), and concluded that 17p– and 11q– (‘poor FISH prognosis group’) correlated with a shorter OS when compared with normal FISH, 13q– or +12 (‘good or intermediate FISH prognosis group,’ $p=0.003$). PFS was not analyzed in this series. The same study reported the occurrence of clonal evolution in a group of patients with the acquisition of new cytogenetic abnormalities during follow-up, almost always 11q– and 17p–. Other studies described this phenomenon in patients with CLL [18,32], which, again, makes the results of prospective studies with data and samples taken at diagnosis of great interest.

Another biological prognostic factor described in the literature is ZAP-70 expression by flow cytometry. ZAP-70 has been reported as a surrogate for somatic mutational status of the IGVH gene [12], which is considered the gold standard biological prognostic factor in patients with CLL, although it is usually not available for clinical practice. In our study, ZAP-70 expression at diagnosis correlated with a shorter PFS in univariate analysis but not in the multivariate Cox regression model. Correlation between ZAP-70 expression and disease progression in CLL has been previously reported in retrospective studies [12,33]. In the prospective series mentioned above [25], ZAP-70 was also associated with a worse outcome in multivariate analysis (hazard ratio 1.03, $p=0.032$). The differences in results between those studies and ours might be due to the lack of a standardized flow cytometry method for assessing ZAP-70, as well as difficulties in finding a consensus on the optimal mode of expression of the results [22].

As in most centers, the IGVH sequencing assay is not feasible for practical routine in our hospital. Our study would probably be more interesting if data regarding IGVH mutational status were available at diagnosis. Future prospective studies are needed to confirm the prognostic impact of this variable in patients with early stage CLL.

In summary, lymphadenopathies at physical examination, CD38 expression by flow cytometry, and 17p– detected by FISH are the prognostic variables statistically significant in this prospective study of patients with early stage CLL. Nevertheless, a longer follow-up is needed to analyze TFS and OS. Despite all the information found in the literature, more prospective studies are required in order to identify prognostic factors at diagnosis that are available for clinical practice in the management of patients with early stage CLL.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

1. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219–234.
2. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198–206.
3. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996;92:382–388.
4. Schwarz J, Mikulenkova D, Cermakova K, et al. Prognostic relevance of the FAB morphological criteria in chronic lymphocytic leukemia: correlations with IgVh gene mutational status and other prognostic markers. *Neoplasma* 2006;53: 219–225.
5. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996;22: 439–447.
6. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109: 4679–4685.
7. Rozman C, Montserrat E, Rodríguez-Fernández JM, et al. Bone marrow histologic pattern: the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood* 1984;64:642–648.
8. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. IgV gene mutational status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94:1840–1847.
9. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002;99:1023–1029.

10. Domingo-Domènech E, Domingo-Claros A, González-Barca E, et al. CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. *Haematologica* 2002;87:1021-1027.
11. Krober A, Seiler T, Benner A, et al. Vh mutational status, CD38 expression level, genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100: 1410-1416.
12. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin variable region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348: 1764-1775.
13. 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 leukemia. *Cancer* 2005;104:2124-2132.
14. Schroers R, Griesinger F, Trumper L, et al. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005;19:750-758.
15. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukaemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-1916.
16. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, et al. 11q deletions identify a new subset of B-chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997;89:2516-2522.
17. Döhner H, Fischer K, Bentz M, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogues in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* 1995;85:1580-1589.
18. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukaemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy and short survival. *Haematologica* 2007;92:1242-1245.
19. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Oncol* 2006;24:4634-4641.
20. Cheson BD, Bennet 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.
21. Oscier DG, Matutes E, Copplestone A, et al. Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol* 1997;98:934-939.
22. Letestu R, Rawstron A, Ghia P, et al. Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukaemia: a multicentric international harmonization process. *Cytometry B Clin Cytom* 2006;70:309-314.
23. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994;8:1640-1645.
24. ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger AG; 1995.
25. 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.
26. Muntañola A, Bosch F, Arguis P, et al. Abdominal computed tomography predicts progression in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2007;25: 1576-1580.
27. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, et al. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;98:2633-2639.
28. Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2002;116:142-150.
29. Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;98:181-186.
30. Mainou-Fowler T, Dignum H, Taylor PR, et al. Quantification improves the prognostic value of CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2002;118:755-761.
31. Jelinek DF, Tschumper RC, Geyer SM, et al. Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2001;115: 854-861.
32. Dewald GW, Brockman SR, Pasternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase FISH: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2003;121: 287-295.
33. Del Principe MI, Del Poeta G, Buccisano F, et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;108:853-861.

2. Trabajo 2 - Correspondiente al segundo artículo publicado:

ORIGINAL ARTICLE

Prospective study of prognostic factors in asymptomatic patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia-like lymphocytosis: the cut-off of $11 \times 10^9/L$ monoclonal lymphocytes better identifies subgroups with different outcomes

A. C. Oliveira · A. Fernández de Sevilla · A. Domingo · E. De La Banda · E. Domingo-Domènech · S. Mercadal · N. Ruiz-Xivillé · E. Alonso · M. Encuentra · E. González-Barca

Annals of Hematology, 2015;94(4):627-32

Se identificaron 307 pacientes diagnosticados de LLC, LLP o LBM entre enero de 2003 y diciembre de 2010. Se realizó un seguimiento prospectivo con una mediana de seguimiento de 61 meses.

2.1. Datos clínicos y biológicos al diagnóstico

Los datos descriptivos de la serie de 307 pacientes fueron superponibles a los de cualquier serie de pacientes con LLC descrita en la literatura y a los datos de los 135 pacientes del trabajo 1, ya resumidos en las tablas 9 y 10. La tabla 13 contiene las formas de presentación clínica y el estadiaje de los pacientes al diagnóstico.

Tabla 13: Clasificación y estadio según Rai de los 307 pacientes con neoplasias linfoides con fenotipo de LLC.

	<i>n</i>	%
Diagnóstico		
LLC	212	69
LLP	14	4.6
LBM	81	26.4
Estadio para los casos de LLC		
Rai		
0	150	70.8
1	37	17.5
2	20	9.4
3	2	0.9
4	3	1.4

El análisis de factores pronósticos se hizo en la población de pacientes que presentaban linfocitos B monoclonales con fenotipo de LLC en SP pero sin ningún otro signo de enfermedad: sin adenopatías, sin citopenias y asintomáticos. Este grupo de 231 pacientes con linfocitosis clonal asintomática (LCA) incluyó los 81 casos de LBM y los 150 casos de LLC con estadio 0 de Rai, formas clínicas aún más iniciales que en el trabajo 1.

Ciento cuarenta y cinco (62.8%) pacientes eran varones y la mediana de edad al diagnóstico fue de 68 años (límites 27-93). La tabla 14 muestra las características biológicas al diagnóstico en los pacientes con LCA y las diferencias entre LBM y LLC Rai 0. Las deleciones 13q- y 11q- fueron más frecuentes en casos de LLC Rai 0 mientras una proporción más elevada de pacientes con LBM

presentó una FISH normal. Los demás factores pronósticos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Tabla 14: Características de laboratorio, inmunofenotípicas y citogenéticas al diagnóstico en 231 pacientes con LCA.

	LLC Rai 0 (n=150)		LBM (n=81)		<i>p</i>
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Morfología atípica	41/150	27.3	20/81	24.7	0.393
B2M elevada	37/114	32.5	19/64	29.7	0.418
LDH elevada	16/149	10.7	13/81	16	0.170
Proteína monoclonal	15/118	12.7	11/67	16.4	0.313
Hipogammaglobulinemia	37/111	33.3	20/61	32.8	0.541
Inmunofenotipo					
CD38	31/147	21.1	22/81	27.2	0.190
ZAP70	20/136	14.7	9/75	12	0.373
FISH					
13q aislada	72/148	48.6	28/81	34.6	0.027
+12 sin 11q o 17p	21/149	14.1	16/81	19.8	0.176
11q sin 17p	9/149	6	0/81	0	0.018
17p	6/150	4	1/81	1.2	0.229
Normal	42/148	28.4	37/81	45.7	0.007
Cariotipo anormal	40/150	26.7	14/81	17.3	0.073

2.2. Análisis de supervivencia y estudio de los factores pronósticos

Con una mediana de seguimiento de 61 meses, la SG para los 231 pacientes con LCA fue de 86.5%. Diecisiete (7.4%) pacientes fallecieron, tres (1.3%) por causas relacionadas a la LLC. Cuarenta y cinco (19.9%) pacientes presentaron progresión de la enfermedad y 36 (15.6%) necesitaron tratamiento durante el seguimiento.

Las variables incluidas en el análisis univariante de factores pronósticos fueron: hipogammaglobulinemia, presencia de proteína monoclonal, morfología linfocitaria atípica, LDH elevada, B2M elevada, CD38 positivo, ZAP-70 positivo, cariotipo anormal y las cinco categorías de la FISH según Dohner (24). En la tabla 15, se resumen los resultados del análisis univariante. Las variables que presentaron un impacto negativo para SLP y SLT en este análisis fueron: morfología atípica, LDH elevada, B2M elevada, CD38 positivo, 11q- y cariotipo anormal.

Tabla 15: Análisis univariante de factores pronósticos al diagnóstico para SLP y SLT en 231 pacientes con LCA.

VARIABLES CLÁSICAS	n (%)	SLP <i>p</i>	SLT <i>p</i>
Hipogammaglobulinemia	57 (65.4)	0.200	0.754
Proteína monoclonal	26 (76.9)	0.066	0.310
Morfología atípica	61 (67.2)	<0.001	0.001
LDH elevada	29 (61.2)	0.005	0.015
B2M elevada	56 (69.6)	0.007	<0.001
VARIABLES BIOLÓGICAS			
CD38 positivo	53 (69.8)	0.037	0.012
ZAP-70 positivo	29 (69)	0.295	0.734
FISH normal	79 (83.5)	0.403	0.595
13q- aislada	100 (82)	0.407	0.299
17p-	7 (85.7)	0.832	0.287
11q- sin 17p-	9 (44.4)	0.007	0.031
+12 sin 11q- o 17p	37 (75.7)	0.358	0.144
Cariotipo anormal	54 (70.4)	0.007	0.008

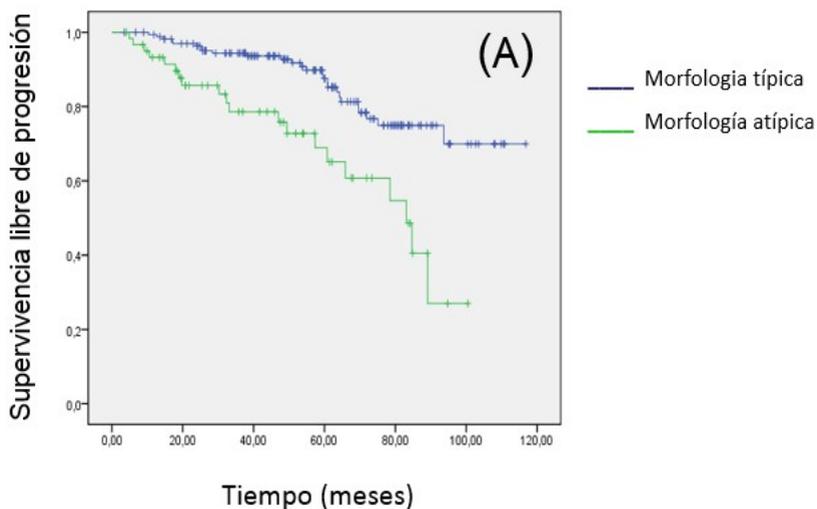
Cuando realizamos el análisis multivariante incluyendo las variables significativas en el análisis univariante, la morfología atípica de los linfocitos y 11q- se correlacionaron con peores SLP y SLT. La B2M elevada también tuvo impacto negativo para SLT (tabla 16).

La figura 9 muestra las curvas de Kaplan Meier para SLP y la figura 10, las curvas para SLT de las variables con valor pronóstico en ambos análisis univariante y de regresión de Cox.

Tabla 16: Análisis multivariante de factores pronósticos al diagnóstico en 231 pacientes con LCA.

Variable pronóstica	SLP			SLT		
	<i>p</i>	OR	IC	<i>p</i>	OR	IC
Morfología atípica	0.015	2.3	1.1-4.8	0.017	2.6	1.1-6.0
B2M elevada	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	0.002	3.4	1.5-7.3
11q-	0.007	4.7	1.5-14.6	0.009	4.5	1.4-14.4

Figura 9: Curvas de Kaplan Meier para SLP en 231 pacientes con LCA en función de: (A) morfología atípica de los linfocitos al diagnóstico ($p < 0.001$) y (B) presencia de 11q- al diagnóstico ($p = 0.007$).



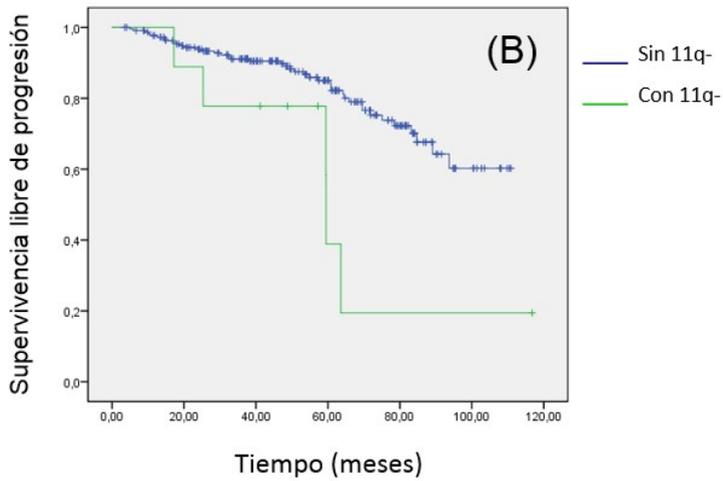
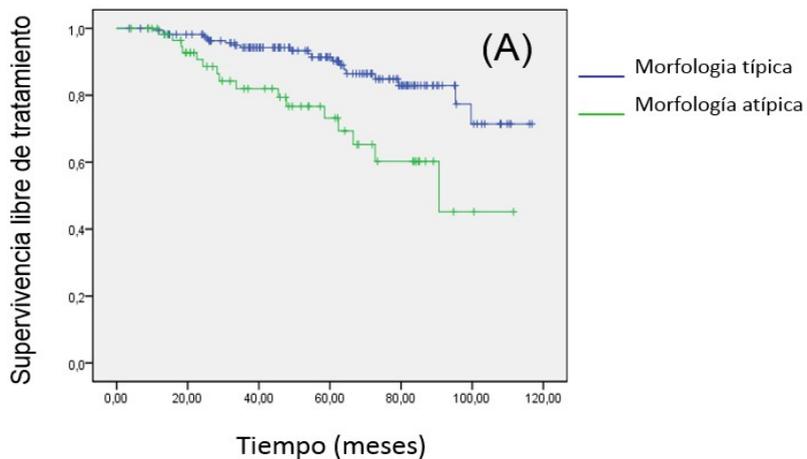
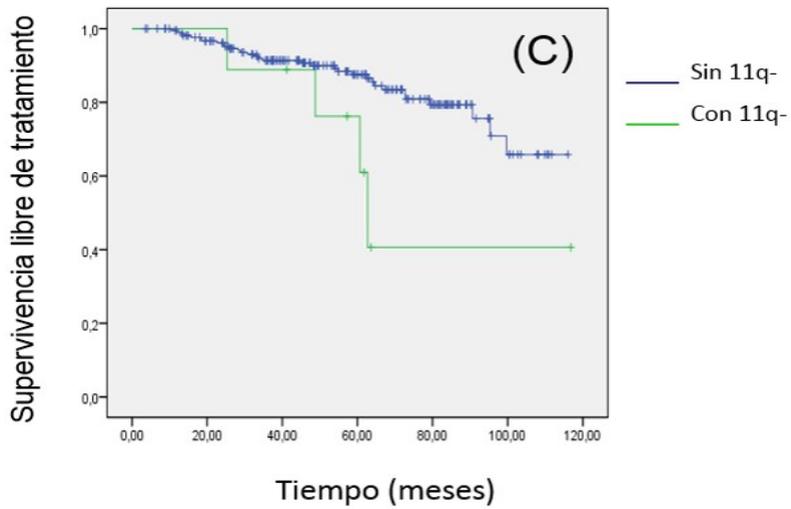
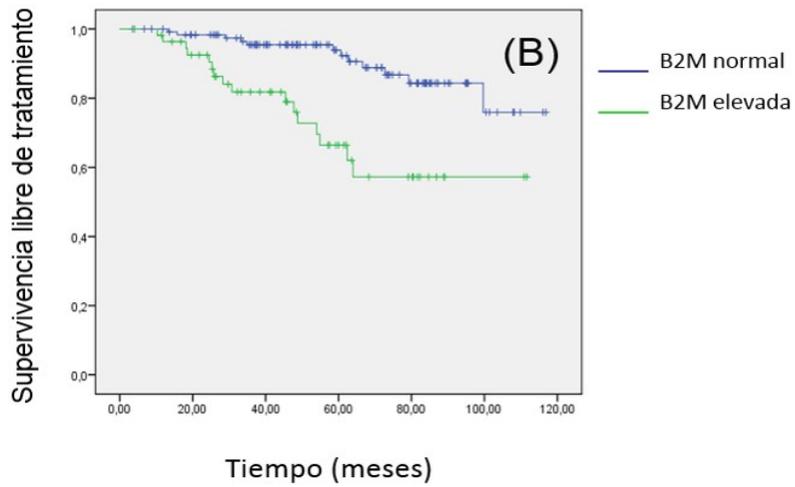


Figura 10: Curvas de Kaplan Meier para SLT en 231 pacientes con LCA en función de: (A) morfología atípica de los linfocitos al diagnóstico ($p=0.001$) y (B) B2M elevada al diagnóstico ($p<0.001$) y (C) presencia de 11q- al diagnóstico ($p=0.031$).





Posteriormente se estudió qué número de linfocitos B clonales al diagnóstico podía identificar un mayor riesgo de progresión y de necesidad de tratamiento. El límite de $11 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales al diagnóstico se correlacionó de forma estadísticamente significativa con la SLP y la SLT. Cuando se añadió como una nueva variable en el análisis multivariante, el valor de $11 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales mantuvo la correlación pronóstica en relación a SLP (OR 3.9, IC 1.8-8.3, $p < 0.001$) y SLT (OR 2.9, IC 1.2-7.3, $p = 0.016$) así como el resto de las variables descritas previamente.

La figura 11 muestra las curvas ROC y los valores de las áreas bajo la curva (AUC) para SLP y SLT según el límite de $11 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales. En la figura 12 se observan las curvas de Kaplan Meier para SLP y SLT también según el mismo límite de linfocitos B clonales al diagnóstico. Finalmente, la figura 13 muestra las curvas de Kaplan Meier sin significación estadística cuando utilizamos el valor de $5 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales, la cifra arbitraria necesaria para el diagnóstico de LLC.

Figura 11: Curvas ROC para (A) SLP y (B) SLT según el valor de 11×10^9 /L linfocitos B clonales.

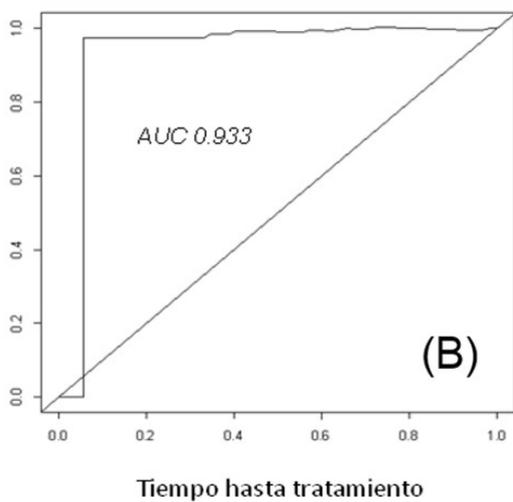
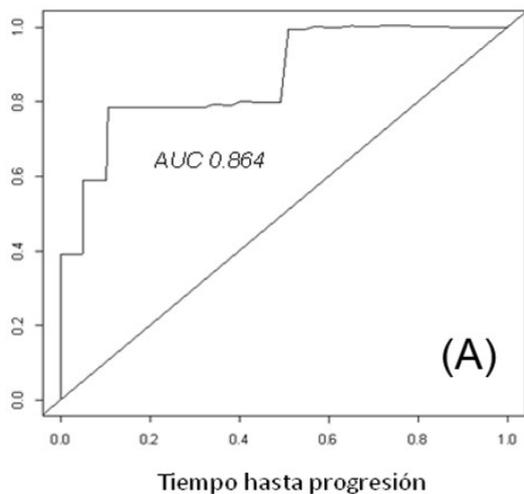


Figura 12: Curvas de Kaplan Meier en 231 pacientes con LCA en función del límite de $11 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales al diagnóstico para (A) SLP ($p=0.001$) y (B) SLT ($p=0.023$).

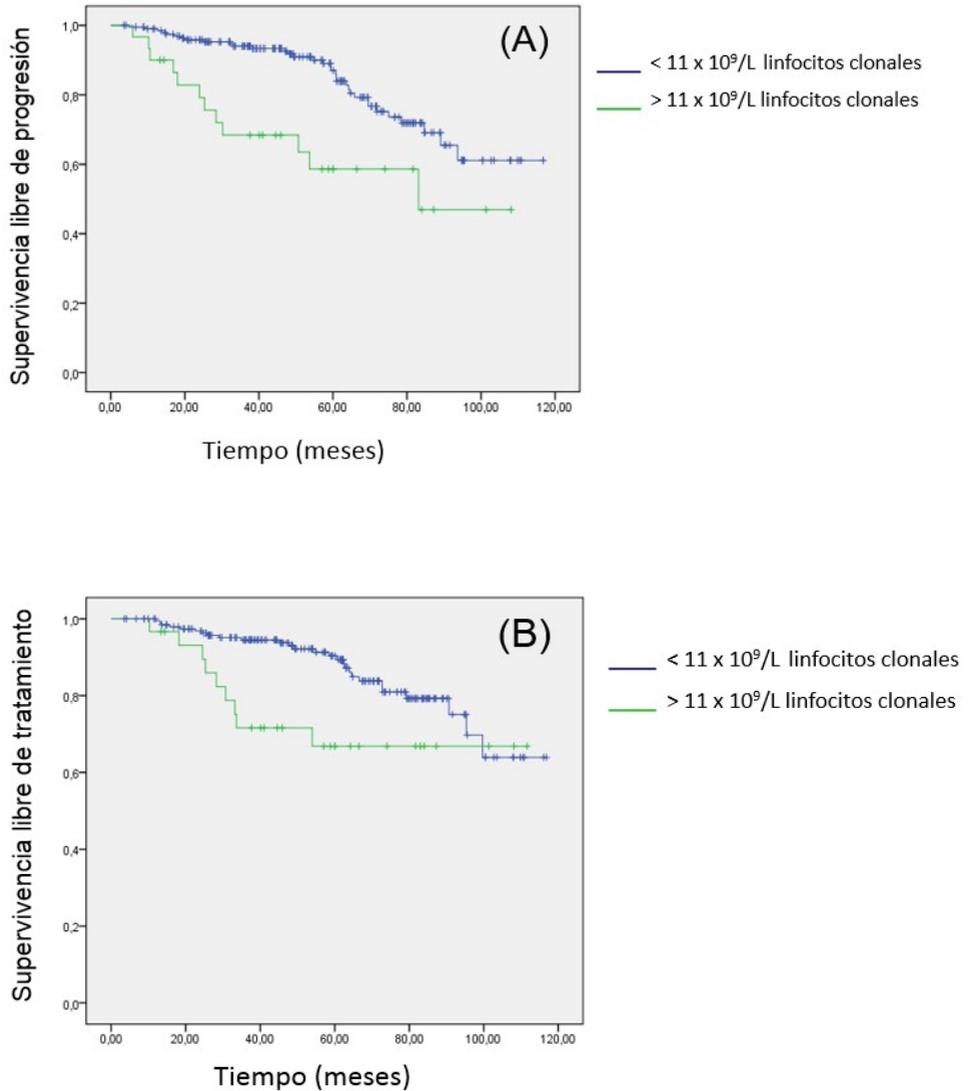
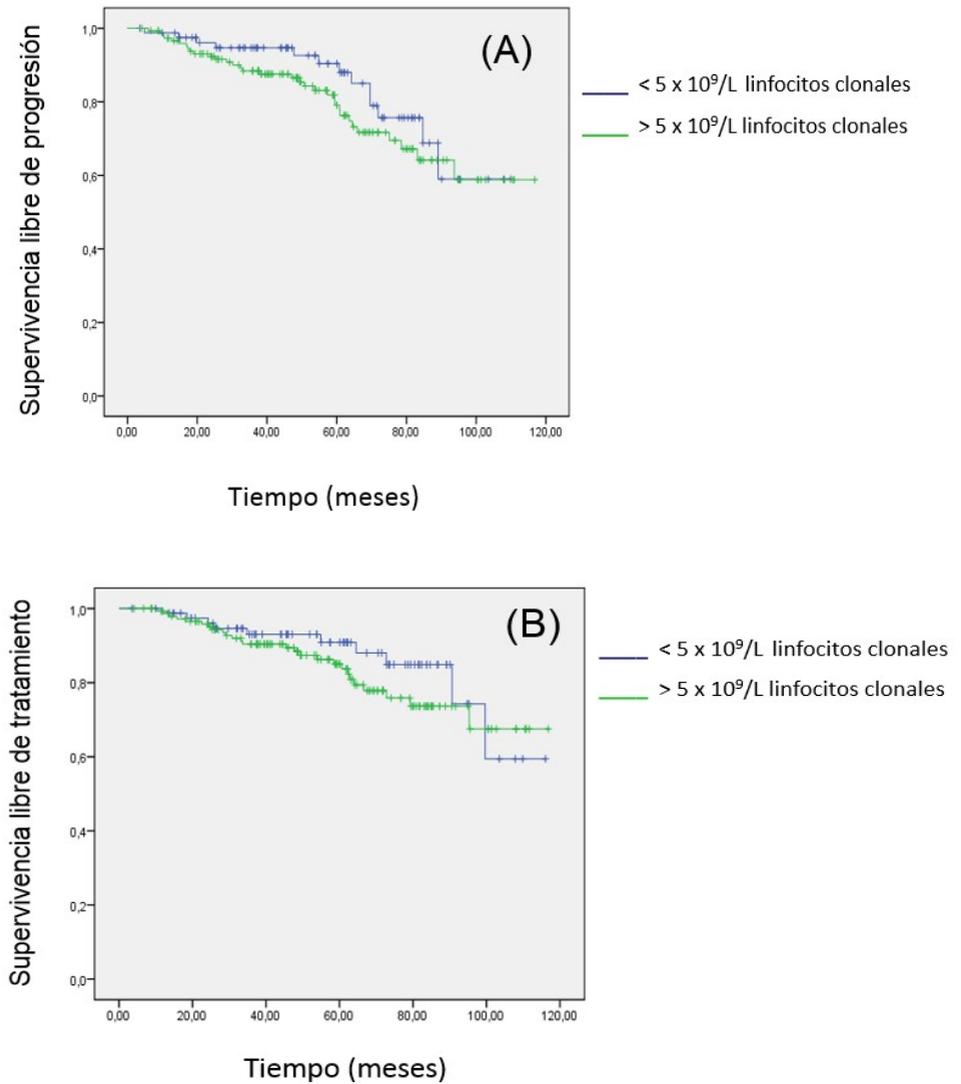


Figura 13: Curvas de Kaplan Meier en 231 pacientes con LCA en función del límite de 5×10^9 /L linfocitos B clonales al diagnóstico para (A) SLP ($p=0.241$) y (B) SLT ($p=0.323$).



Prospective study of prognostic factors in asymptomatic patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia-like lymphocytosis: the cut-off of $11 \times 10^9/L$ monoclonal lymphocytes better identifies subgroups with different outcomes

A. C. Oliveira · A. Fernández de Sevilla · A. Domingo · E. De La Banda · E. Domingo-Domènech · S. Mercadal · N. Ruiz-Xivillé · E. Alonso · M. Encuentra · E. González-Barca

Received: 12 July 2014 / Accepted: 22 November 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract The arbitrary threshold of $5 \times 10^9/L$ chronic lymphocytic leukemia (CLL)-like lymphocytes differentiates monoclonal B lymphocytosis (MBL) from CLL. There are no prospective studies that search for the optimal cut-off of monoclonal lymphocytes able to predict outcome and simultaneously analyze the prognostic value of classic, immunophenotypic, and cytogenetic variables in patients with asymptomatic clonal CLL lymphocytosis (ACL), which includes MBL plus Rai 0 CLL patients. From 2003 to 2010, 231 ACL patients were enrolled in this study. Patients with 11q deletion and atypical lymphocyte morphology at diagnosis had shorter progression-free survival (PFS) ($p=0.007$ and $p=0.015$, respectively) and treatment-free survival (TFS) ($p=0.009$ and $p=0.017$, respectively). Elevated beta-2 microglobulin (B2M) also correlated with worse TFS ($p=0.002$). The optimal threshold of monoclonal lymphocytes independently correlated with survival was $11 \times 10^9/L$ ($p=0.000$ for PFS and $p=0.016$ for TFS). As conclusion, monoclonal

lymphocytosis higher than $11 \times 10^9/L$ better identifies two subgroups of patients with different outcomes than the standard cut-off value of $5 \times 10^9/L$. Atypical lymphocyte morphology, 11q deletion and elevated B2M had a negative impact on the survival in ACL patients.

Keywords CLL · MBL · Monoclonal lymphocyte cut-off · FISH · Prognosis

Introduction

Main diagnostic criteria for B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) according to 2008 NCI Guidelines is the presence of at least $5 \times 10^9/L$ monoclonal B lymphocytes in the peripheral blood with the characteristic CLL immunophenotype by flow cytometry during a period longer than 3 months. Asymptomatic patients who present smaller monoclonal lymphocyte population with a CLL phenotype who do not have lymphadenopathies, organomegalies, or cytopenias shall be classified as monoclonal B lymphocytosis (MBL) [1]. However, the threshold of $5 \times 10^9/L$ monoclonal lymphocytes is arbitrary and it has not been properly validated in prospective studies.

Two different types of MBL can be identified. Individuals with normal blood counts in whom monoclonal lymphocytes are detected during population screening for epidemiological purposes (low count MBL) show a very small probability, if any, of progression to CLL [2]. On the other hand, those patients who are referred for hematological evaluation because of lymphocytosis (clinical MBL) will develop CLL and require treatment

A. C. Oliveira (✉) · A. Fernández de Sevilla · E. Domingo-Domènech · S. Mercadal · E. González-Barca
Department of Clinical Hematology, Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals, IDIBELL, Gran Via 199-203, Hospitalet, 08908 Barcelona, Spain
e-mail: acoliveira@iconcologia.net

A. Domingo · E. De La Banda · E. Alonso
Department of Hematology, Hospital de Bellvitge, IDIBELL, Hospitalet, Barcelona, Spain

N. Ruiz-Xivillé
Department of Hematology, Institut Català d'Oncologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, IJC, Badalona, Barcelona, Spain

M. Encuentra
Clinical Investigation Unit, Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals, IDIBELL, Hospitalet, Barcelona, Spain

at a rate of 1.1 % per year [3]. According to previous reports, clinical MBL is very similar to Rai 0 CLL regarding microRNA and immunogenetic profiles [4–6]. These data suggest that clinical MBL and Rai 0 CLL should be seen as a unique group of patients in different phases of the same disease who presents asymptomatic clonal CLL-like lymphocytosis (ACL).

Some studies have analyzed the prognostic value of chromosomal alterations by fluorescent in situ hybridization (FISH) while others have searched the most appropriate monoclonal lymphocyte count able to predict outcome in ACL [3, 6–11]. None of them, though, have addressed both issues and also analyzed the prognostic role of classic variables in a prospective and multivariate way in an ACL cohort.

We describe a series of 307 consecutive patients presenting with CLL clonal lymphocytes in one single reference center for hematological malignancies and belonging to the same geographic area. A prospective follow-up was focused in 231 ACL patients without any other sign of disease. The main objectives were to find a significant monoclonal lymphocyte count able to predict outcome as well as identify other prognostic variables for PFS and TFS in this group of patients. In this study, all laboratory and biological parameters tested are routinely used in clinical practice in CLL and were available in virtually all cases at diagnosis.

Patients and methods

Patients

Three hundred and seven consecutive untreated patients diagnosed with MBL, small lymphocytic lymphoma (SLL), or CLL in one single center from January 2003 to December 2010 were prospectively included in this study. Clinical and laboratory data, Rai staging, immunophenotyping, and FISH cytogenetics were reported at diagnosis. Analysis of prognostic factors and survival was performed in the cohort of 231 patients with ACL, which included MBL plus Rai 0 CLL patients.

The study was approved by our Institution's Ethic Committee Board, and all patients provided informed consent. All procedures followed were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008.

Classification into MBL, SLL, or CLL was made according to 2008 NCI Guidelines and based in absolute number of monoclonal B lymphocytes by flow cytometry [1]. Those cases diagnosed before 2008 had their classification retrospectively reviewed.

Patients were prospectively followed up for progression of disease, need for treatment, or death. Treatment was initiated following standard guidelines criteria [1, 12].

Methods

The following classic variables were analyzed for prognosis: atypical lymphocyte morphology, hypogammaglobulinemia, monoclonal protein, elevated lactate dehydrogenase (LDH), and elevated beta-2 microglobulin (B2M). Lymphocyte morphology was evaluated in all cases in the same laboratory and by the same experts according to the French-American-British (FAB) classification of leukemias [13]. Atypical CLL included two morphology subtypes: the CLL/prolymphocytic leukemia, with more than 10 % circulating prolymphocytes and the mixed subtype, with more than 15 % elements with lymphoplasmacytic aspect and cleaved cells.

Flow cytometry, FISH, and conventional cytogenetic techniques were performed as previously described [14]. CD38 was considered positive when at least 30 % of pathologic lymphocytes expressed the corresponding antibody, while ZAP70 was considered positive above 20 %. FISH results were divided into the five hierarchical categories classically described by Dohner: normal FISH, presence of isolated 13q deletion, presence of 12 trisomy alone or with 13q deletion, presence of 11q deletion with or without other abnormality but 17p deletion, and presence of 17p deletion with or without other abnormality [15]. The presence of more than 10 % nuclei with the referred abnormality was considered a positive result.

Statistical analysis

Crosstabs were used to compare the frequencies of variables between groups. Comparison of categorical variables was performed using χ^2 test.

Progression-free survival (PFS) was defined as the time between diagnosis and the first sign of disease progression as described previously [14]. Treatment-free survival (TFS) was defined as the time from diagnosis until the first treatment required. Survival curves were plotted using Kaplan-Meier's method, and log-rank test was used to identify differences in survival between subgroups. Multivariate analysis for survival was performed with a Cox regression model.

Receiver operating characteristic (ROC) curves for censored survival data were used to test the various thresholds of monoclonal lymphocyte count for PFS and TFS [16].

All analyses were performed at a 95 % confidence interval and differences were considered statistically significant when p value was less than 0.05. Statistical

analysis was made using SPSS software, version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Clinical, laboratory, and biological data of the 307 patients at diagnosis did not differ from any CLL series previously reported (data not shown). Diagnosis and Rai staging data are shown in Table 1.

Two hundred thirty-one patients had ACL, which included 81 patients classified as MBL plus 150 patients classified as Rai 0 CLL. One hundred forty-five (62.8 %) patients were male and median age at diagnosis was 68 years (limits 27–93 years). Table 2 shows prognostic factors at diagnosis in patients with ACL and differences between Rai 0 CLL and MBL subgroups. Deletions of 13q and 11q were significantly more frequent in Rai 0 CLL than in MBL patients while a normal FISH was found in a higher proportion of MBL patients.

With a median follow-up time of 61 months, overall survival (OS) for 231 ACL patients was 86.5 %. Seventeen (7.4 %) patients died and only 3 (1.3 %) due to CLL related causes. Forty-six (19.9 %) patients presented disease progression and 36 (15.6 %) patients required treatment during the follow-up period.

Variables included in the analysis for prognostic factors were: hypogammaglobulinemia, monoclonal protein, atypical lymphocyte morphology, elevated LDH, elevated B2M, positive CD38, and positive ZAP70 by flow cytometry, abnormal conventional karyotype, and FISH categorical results. Elevated LDH, elevated B2M, atypical lymphocyte morphology, CD38 expression, abnormal karyotype, and 11q deletion by FISH had all a negative impact on PFS and TFS in univariate analysis. Atypical lymphocyte morphology and 11q deletion were correlated with worse PFS and TFS in the multivariate analysis. Elevated B2M was also significant for TFS (Table 3).

Table 1 Classification and Rai staging at diagnosis in 307 patients with CLL-like lymphocytosis

	<i>n</i>	Percentage
Diagnosis		
CLL	212	69
SLL	14	4.6
MBL	81	26.4
Staging of CLL cases		
Rai 0	150	70.8
1	37	17.5
2	20	9.4
3	2	0.9
4	3	1.4

To search for the optimal monoclonal lymphocyte count able to predict survival in the ACL patients, we measured the risk of each increase of $1 \times 10^9/L$ monoclonal lymphocytes regarding to PFS and TFS, starting from $1 \times 10^9/L$ until $20 \times 10^9/L$ cells. According to this analysis, $11 \times 10^9/L$ was the monoclonal lymphocyte threshold able to identify two groups with different PFS and TFS in our series (Figs. 1 and 2). This did not happen either when the chosen value was the standard $5 \times 10^9/L$ or with any other limit beyond $11 \times 10^9/L$ cells.

When included as a new variable in the multivariate analysis, the cut-off of $11 \times 10^9/L$ monoclonal lymphocytes had an independent prognostic impact in both PFS (OR 3.9, CI 1.8–8.3, $p=0.000$) and TFS (OR 2.9, CI 1.2–7.3, $p=0.016$) together with the other variables described before.

Discussion

Some retrospective studies analyzed the prognostic value of monoclonal lymphocyte count in ACL patients but did not simultaneously test the role of CLL cytogenetic prognostic factors [8–10]. Other few authors explored the prognostic role of cytogenetic, but not of classic variables in ACL patients [6, 11, 17]. In our study, we search for the optimal monoclonal lymphocyte cut-off able to predict survival in ACL patients and prospectively analyze the correlation of classic, immunophenotypic, and cytogenetic variables with outcome.

In our ACL series, no differences were found between MBL and Rai 0 CLL regarding the frequency of classic variables at diagnosis. However, among MBL patients, normal FISH was more frequent ($p=0.007$) than in Rai 0 CLL, while cases with Rai 0 CLL showed a higher frequency of either 13q deletion ($p=0.027$) or 11q deletion ($p=0.018$) than MBL cases. In a study published before the 2008 NCI Guidelines [1], Tsimberidou et al. [18] retrospectively analyzed the biological characteristics of more than 2000 patients with CLL and separated them according to the limit of $5 \times 10^9/L$ absolute lymphocytes (not monoclonal). Despite being a heterogeneous group of patients, they found karyotype and FISH abnormalities to happen in both groups but in a higher frequency in patients with more than $5 \times 10^9/L$ lymphocytes. Kern et al. [11] also reported a higher frequency of chromosomal aberrations by FISH in patients with Rai 0 CLL comparing with MBL while Rossi et al. [17] and Morabito et al. [6] described a lower prevalence of 11q and 17p deletions in MBL cases. On the other hand, clinical MBL seem to be very similar to Rai 0 CLL regarding to microRNA signature and immunogenetic profile [5, 6]. Altogether, these findings suggest that clinical MBL and Rai 0 CLL could simply correspond to different phases of the same disease and that, the larger the clone, the more frequent the acquisition of cytogenetic abnormalities.

Table 2 Classic and cytogenetic prognostic factors at diagnosis in patients with asymptomatic clonal lymphocytosis

Classic parameters	Rai 0 CLL (n=150)		MBL (n=81)		p
	n	Percentage	n	Percentage	
Atypical morphology	41/150	27.3	20/81	24.7	0.393
Elevated B2M	37/114	32.5	19/64	29.7	0.418
Elevated LDH	16/149	10.7	13/81	16	0.170
Monoclonal protein	15/118	12.7			0.313
Hypogammaglobulinemia	37/111	33.3	20/61	32.8	0.541
Immunophenotypic parameters					
CD38	31/147	21.1	22/81	27.2	0.190
ZAP70	20/136	14.7	9/75	12	0.373
Cytogenetic parameters					
FISH					
Isolated 13q	72/148	48.6	28/81	34.6	0.027
+12 without 11q or 17p	21/149	14.1	16/81	19.8	0.176
11q without 17p	9/149	6	0/81	0	0.018
17p	6/150	4	1/81	1.2	0.229
Normal	42/148	28.4	37/81	45.7	0.007
Abnormal karyotype	40/150	26.7	14/81	17.3	0.073

We have then analyzed the impact of different variables in the survival of ACL as a unique group, based on the findings described above. Deletion of 11q was the only cytogenetic parameter associated with worse PFS and TFS. In CLL patients, it has a clear correlation with advanced disease, extensive lymph node involvement, and a shorter time to treatment (TTT) [15, 19, 20]. In patients with early-stage CLL expansions, as in our cohort, this cytogenetic aberration has no well-established role. Rossi et al. [17] found 17p deletion and 12 trisomy, but not 11q deletion, to be related to worse PFS and TFS in a prospective series of MBL patients. On the other hand, Kern et al. [11] reported a shorter TTT in patients with 11q deletion in both MBL and Rai 0 CLL cohorts. In a previous series described by our group with a shorter follow-up and a smaller number of cases, we found 17p deletion, but not 11q deletion, to show prognostic value in multivariate analysis regarding PFS in Rai 0–1 CLL patients [14]. It is possible that 17p deletion does not have a prognostic relevance in our present study because it is found with a very low

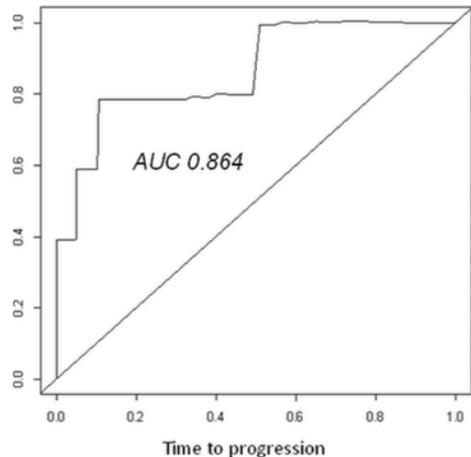
frequency in these first steps of monoclonal lymphocytosis as it occurs later in lymphocyte clonal evolution.

Regarding classic prognostic factors, atypical morphology was a strong predictor of both PFS and TFS. In CLL, it has been classically correlated with a worse outcome. In 1997, Oscier et al. [21] reported its association with disease progression, and in 2006, Schwarz et al. [22] described its correlation with a shorter OS. Since then, no studies have been published

Table 3 Multivariate analysis of prognostic factors in 231 patients with asymptomatic clonal lymphocytosis

Prognostic variable	PFS			TFS		
	p	OR	CI	p	OR	CI
Elevated B2M	NS	NS	NS	0.002	3.4	1.5–7.3
Atypical morphology	0.015	2.3	1.1–4.8	0.017	2.6	1.1–6.0
11q deletion	0.007	4.7	1.5–14.6	0.009	4.5	1.4–14.4

NS not significant

**Fig. 1** ROC curve for progression-free survival data with $11 \times 10^9/L$ monoclonal lymphocyte cut-off

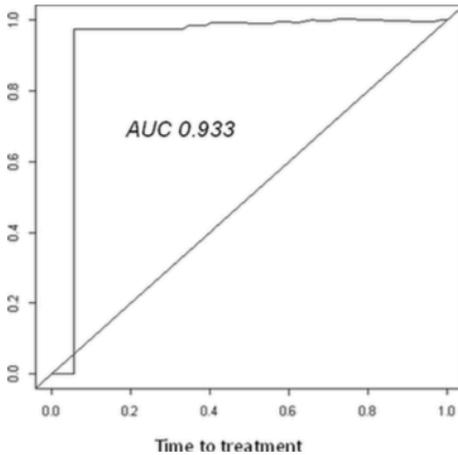


Fig. 2 ROC curve for treatment-free survival data with $11 \times 10^9/L$ monoclonal lymphocyte cut-off

addressing this subject. We think it is an interesting finding that a cheap and easily available tool as microscopic examination of lymphocyte morphology can have a strong prognostic value in ACL patients. Also interestingly, B2M was the other classic variable with significance in multivariate analysis regarding TFS. The negative impact of this prognostic marker in CLL was first described in 1996 by Hallek et al. [23]. Lately, other authors also reported its correlation with survival in patients diagnosed with CLL in all stages of the disease [17, 19, 24]. More recently, Letestu et al. [25] have proposed a prognostic score based on routine parameters with significance for PFS in a multivariate analysis of 339 Binet A stage CLL patients and have found elevated B2M to be one of the strongest variables.

We also have searched for the most appropriate monoclonal lymphocyte threshold able to identify different prognostic subgroups within ACL group and found that patients with more than $11 \times 10^9/L$ at diagnosis had significantly worse PFS and TFS. Other authors have described similar values of monoclonal lymphocytes to be correlated with outcome in retrospective cohorts. Molica et al. [10] found the limit of $10 \times 10^9/L$ absolute B lymphocytes to be associated with TTT in a multivariate analysis, and Scarfò et al. [7] described the same cut-off regarding PFS and TFS while Shanafelt et al. [8] reported $11 \times 10^9/L$ to be the one that predicted TFS an OS in their series. Only one prospective study correlated the $5 \times 10^9/L$ absolute B lymphocytes cut-off with the likelihood of progression when three or more unfavorable prognostic variables were present in the same patient [6]. Although most of these studies are based in the absolute (and not monoclonal) B lymphocyte count, their data suggest that maybe ACL patients

should be stratified into two prognostic subgroups based in a higher threshold of monoclonal lymphocytes.

As conclusion, MBL and Rai 0 CLL correspond to a single group of patients in different phases of the same disease. In clinical practice, the identification of patients with ACL who will develop progressive CLL and require treatment is difficult. Monoclonal lymphocytosis higher than $11 \times 10^9/L$ better identifies two subgroups with different outcomes than the standard cut-off value of $5 \times 10^9/L$. Moreover, atypical lymphocyte morphology and 11q deletion by FISH at diagnosis correlated to progression of disease and need for treatment. Elevated B2M also had a negative impact in TFS.

Acknowledgments This study was supported by "Instituto de Salud Carlos III" (RTICC RD12/0036/0029).

Conflict of interest The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding No funding was received for this study.

References

- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ (2008) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111:5446–5456
- Fazi C, Scarfò L, Pecciarini L, Dagklis A, Janus A, Talarico A, Scielzo C, Sala C, Toniolo D, Caligaris-Cappio F, Ghia P (2011) General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood* 118:6618–6625
- Rawstron AC, Bennet FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton JA, Plummer M, de Tute R, Owen RG, Richards SJ, Jack AS, Hillmen P (2008) Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 359:575–583
- Dagklis A, Fazi C, Sala C, Cantarelli V, Scielzo C, Massacane R, Toniolo D, Caligaris-Cappio F, Stamatopoulos K, Ghia P (2009) The immunoglobulin gene repertoire of low-count chronic lymphocytic leukemia (CLL)-like monoclonal B lymphocytosis different from CLL: diagnostic implications for clinical monitoring. *Blood* 114:26–32
- Vardi A, Dagklis A, Scarfò L et al (2013) Immunogenetics shows that not all MBL are equal: the larger the clone, the more similar to CLL. *Blood* 121:4521–4528
- Morabito F, Mosca L, Cutrona G et al (2013) Clinical monoclonal B lymphocytosis versus Rai 0 chronic lymphocytic leukemia: a comparison of cellular, cytogenetic, molecular and clinical features. *Clin Cancer Res* 19:5890–5900
- Scarfò L, Zibellini S, Tedeschi A, Maura F, Neri A, Bertazzoni P, Sarina B, Nalli G, Motta M, Rossini F, Cortelezzi A, Montillo M, Orlandi E, Ghia P (2012) Impact of B-cell count and imaging screening in cMBL: any need to revise the current guidelines? *Leukemia* 26:1703–1707
- Shanafelt TD, Kay NE, Jenkins G, Call TG, Zent CS, Jelinek DF, Morice WG, Boysen J, Zakkro L, Schwager S, Slager SL, Hanson CA (2009) B-cell count and survival: differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-cell lymphocytosis based on clinical outcome. *Blood* 113:4188–4196

9. Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, Call TG, Zent CS, Maddocks K, Jenkins G, Jelinek DF, Morice WG, Boysen J, Schwager S, Bowen D, Slager SL, Hanson CA (2009) Brief report: natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 27:3959–3963
10. Molica S, Mauro FR, Giannarelli D, Lauria F, Cortelezzi A, Brugiatielli M, Liso V, Cuneo A, Foà R (2011) Differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-lymphocytosis according to clinical outcome: on behalf of GIMEMA chronic lymphoproliferative diseases working group. *Hematologica* 96:277–283
11. Kern W, Bacher U, Haferlach C, Dickler F, Alpermann T, Schnittger S, Haferlach T (2012) Monoclonal B-cell lymphocytosis is closely related to chronic lymphocytic leukaemia and may be better classified as early-stage CLL. *Br J Haematol* 157:86–96
12. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR (1996) National Cancer Institute-Sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87:4990–4997
13. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1989) Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol* 42:567–584
14. Oliveira AC, De La Banda E, Domingo-Domènech E, Encuentra M, Mercadal S, Domingo A, Alonso E, Espinet B, Grau J, De Sevilla AF, Gonzalez-Barca E (2011) Prospective study of clinical and biological prognostic factors at diagnosis in patients with early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 52:429–435
15. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukaemia. *N Engl J Med* 343:1910–1916
16. Heagerty PJ, Lumley T, Pepe MS (2000) Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker. *Biometrics* 56:337–344
17. Rossi D, Sozzi E, Puma A et al (2009) The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br J Haematol* 146:64–75
18. Tsimberidou AM, Wen S, O'Brien S et al (2007) Assessment of chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma by absolute lymphocyte counts in 2126 patients: 20 years of experience at the University of Texas MD Anderson Cancer Center. *J Clin Oncol* 25:4648–4656
19. Wierda WG, O'Brien S, Wang X et al (2011) Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 29:4088–4095
20. Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weiglun T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P (1997) 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 89:2516–2522
21. Oscier DG, Matutes E, Copplestone A, Pickering RM, Chapman R, Gillingham R, Catovsky D, Hamblin TJ (1997) Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol* 98: 934–939
22. Schwarz J, Mikulenкова D, Cermakova K et al (2006) Prognostic relevance of the FAB morphological criteria in chronic lymphocytic leukemia: correlations with IgVh gene mutational status and other prognostic markers. *Neoplasma* 53:219–225
23. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, Schick HD, Kuhn-Hallek I, Emmerich B (1996) Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 22:439–447
24. Delgado J, Pratt G, Phillips N, Briones J, Fegan C, Nomdedeu J, Pepper C, Aventin A, Ayats R, Brunet S, Martino R, Valcarcel D, Milligan D, Sierra J (2009) Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *Br J Haematol* 145:801–805
25. Letestu R, Lévy V, Eclache V, Baran-Marszak F, Vaur D, Naguib D, Schischmanoff O, Katsahian S, Nguyen-Khac F, Davi F, Merle-Béral H, Troussard X, Ajchenbaum-Cymbalista F (2010) Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood* 116:4588–4590

DISCUSIÓN

1. Índices pronósticos en LLC

Los dos trabajos descritos en el presente documento son el resultado de un estudio prospectivo de todos los pacientes diagnosticados de LLC, LBM y LLP en el ICO - HDiR entre enero de 2003 y diciembre de 2010, en el que se hace una valoración de los estadios iniciales de la enfermedad con el objetivo de describir factores pronósticos presentes al momento del diagnóstico disponibles en la práctica clínica, para identificar aquellos pacientes que se podrían beneficiar de tratamiento de forma más precoz.

El análisis del trabajo 1 se hizo en 2008 con 135 pacientes. En aquel momento el concepto de LBM se acababa de publicar, los pacientes se diagnosticaron según los criterios de 1996 (6) y se estudiaron los 114 casos con estadios de Rai 0-1. Se analizó el impacto de diferentes variables en relación al riesgo de progresión de la enfermedad. La tabla 17 resume las características del trabajo 1.

Tabla 17: Resumen del trabajo 1.

Periodo de inclusión	2003-2006
Número de pacientes incluidos	135
Año de realización del análisis	2008
Número de pacientes estudiados	114
Tipo de cohorte	Rai 0 + Rai 1
Supervivencia analizada	SLP
Mediana de seguimiento	39 meses
Factores de mal pronóstico	
Variable clásica	Adenopatías
Variables biológicas	CD38 positivo
	Delección 17p-

En el trabajo 1, la presencia de adenopatías al diagnóstico tuvo más valor pronóstico para la progresión de la enfermedad que cualquiera de las otras variables, clásicas o biológicas. Cuando solo se analizaron las variables biológicas, la positividad para CD38 por citometría de flujo se correlacionó con peor SLP. La presencia de 17p- casi alcanzó significación estadística para SLP. Las principales limitaciones del trabajo 1 fueron el tamaño pequeño de la cohorte y el seguimiento relativamente corto.

En el trabajo 2 se incluyeron 307 pacientes con LLC, LBM o LLP. El análisis se hizo en 2013 y se valoraron los 231 casos en estadios muy precoces de la enfermedad, con presencia de linfocitos B clonales en sangre periférica pero totalmente asintomáticos y sin adenopatías u otros signos de enfermedad (pacientes con LCA, que incluyen los casos de LLC Rai 0 y LBM). Además de estudiar el papel pronóstico de las variables clásicas y biológicas, se analizó la cantidad de linfocitos B monoclonales al diagnóstico capaz de predecir la progresión y la necesidad de tratamiento en este grupo de pacientes. La tabla 18 resume las principales características del trabajo 2.

Tabla 18: Resumen del trabajo 2.

Periodo de inclusión	2003-2010
Número de pacientes incluidos	307
Año de realización del análisis	2013
Número de pacientes estudiados	231
Tipo de cohorte	LBM + Rai 0
Supervivencia analizada	SLP y SLT
Mediana de seguimiento	61 meses
Factores de mal pronóstico	
Variables clásicas	Morfología linfocitaria atípica B2M elevada
Variable biológica	Delección 11q-
Límite de linfocitos B clonales	> 11 x 10 ⁹ /L

En el trabajo 2, la morfología atípica de los linfocitos y la B2M elevada al diagnóstico fueron las dos variables clásicas con impacto negativo en el pronóstico de los pacientes con LCA. Estas dos variables también presentaron significación estadística en el análisis univariante para SLP del trabajo 1 ($p=0.001$ y $p=0.02$, respectivamente), juntamente con la presencia de adenopatías al diagnóstico. En relación a las variables biológicas, solo 11q- se correlacionó con peores SLP y SLT en los pacientes con LCA en el trabajo 2. La presencia de 17p- no tuvo impacto pronóstico en el trabajo 2. Quizás este hecho se podría explicar por la baja

frecuencia de esta anomalía en pacientes en estadios muy iniciales de la LLC (82). Además, en el trabajo 2 se identificó que el valor $11 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales se correlacionaba con la SLP y la SLT en los pacientes con LCA.

Los datos publicados en la literatura en los últimos 25 años sobre factores pronósticos en LLC son muy heterogéneos. De los estudios que realizan análisis multivariante, 34 son retrospectivos y solo 6 son prospectivos. Las tablas 19 y 20 resumen esas publicaciones desde 1990 hasta la actualidad.

Tabla 19: Resumen de los principales estudios retrospectivos de factores pronósticos en LLC de 1990 a 2015, que incluyen análisis multivariante.

Autores	n	Tipo de cohorte	Año	Supervivencia analizada	Variables analizadas	Variables significativas
Juliusson <i>et al</i> (61)	391	LLC todos los estadios	1990	SG	Edad, Binet, Rai, sexo, % metafases anormales y nº de anomalías cromosómicas, leucocitosis, +12, alteraciones 14q*	Edad, Binet, sexo, % metafases anormales
Vallespi <i>et al</i> (12)	146	LLC todos los estadios	1991	SG	Edad, síntomas B, adenopatías, EMG*, HMG*, leucocitos, linfocitos, neutrófilos, Hb, plaquetas, % series roja, blanca y megacariocítica en MO, LDH, Rai, Binet, TDL, % prolinfocitos y linfocitos en MO	Rai, edad, % prolinfocitos en MO, leucocitos
Mauro <i>et al</i> (41)	335	LLC todos los estadios	1994	SG	Rai, Binet, adenopatías, EMG, síntomas B, Hb, plaquetas, linfocitos, patrón BMO	Rai, Binet, Hb
Dohner <i>et al</i> (83)	100	LLC todos los estadios + enfermedad de Waldenström	1995	SG	Edad, sexo, Rai, leucocitos, Hb, plaquetas, LDH, FA*, albumina, EMG, adenopatías, 17p-	Edad, Rai, Hb, 17p-
Sarfati <i>et al</i> (36)	100	LLC Binet A	1996	SLP	CD23 soluble, Rai, adenopatías	CD23 soluble

*14q: brazo largo del cromosoma 14; EMG: esplenomegalia; HMG: hepatomegalia; FA: fosfatasa alcalina.

Tabla 19: Continuación.

Autores	n	Tipo de cohorte	Año	Supervivencia analizada	Variables analizadas	Variables significativas
Hallek <i>et al</i> (29)	154	LLC todos los estadios + inmunocitomas	1996	SLP	Sexo, edad, diagnóstico, Karnofsky#, linfocitos, Hb, plaquetas, creatinina, LDH, B2M, TK, n° áreas ganglionares, intervalo diagnóstico-tratamiento, tratamiento previo	Plaquetas, B2M, TK, Karnofsky
Geisler <i>et al</i> (42)	575	LLC todos los estadios, no tratados	1996	SG	Edad, sexo, estadio, patrón BMO, linfocitos en MO, leucocitosis	Edad, estadio
Dohner <i>et al</i> (84)	214	LLC todos los estadios	1997	SG	Edad, sexo, Rai, 11q-	Edad, Rai, 11q-
Oscier <i>et al</i> (13)	270	LLC Binet A	1997	SLP	Sexo, edad, TDL, adenopatías, linfocitos, morfología atípica, cariotipo	Morfología atípica, cariotipo, +12, linfocitos > 30 x 10 ⁹ /L, TDL, más de 1 área ganglionar
Criel <i>et al</i> (14)	390	LLC todos los estadios	1997	SG	Morfología atípica, Binet, Rai, cariotipo anormal, +12	Morfología atípica, Binet, Rai, +12
Hallek <i>et al</i> (35)	122	LLC Binet A	1999	SLP	TK, leucocitos, TDL, adenopatías, IgA*, IgM*, IgG*, linfocitos, B2M, plaquetas, Rai, IFN*, EMG, LDH, tiempo desde el diagnóstico, neutrófilos, patrón BMO nodular, Hb	TK, leucocitos > 75 x 10 ⁹ /L, adenopatías

#Ver anexo 2

*IgA: inmunoglobulina A; IgG: inmunoglobulina G; IgM: inmunoglobulina M; INF: tratamiento con interferón.

Tabla 19: Continuación.

Autores	n	Tipo de cohorte	Año	Supervivencia analizada	Variables analizadas	Variables significativas
Dohner <i>et al</i> (24)	325	LLC todos los estadios	2000	SG	Edad, sexo, Binet, Rai, Hb, leucocitos, plaquetas, LDH, FA, EMG, número y tamaño de adenopatías, 13q-, +12, 11q-, 17p-, 6q-	Binet, edad, LDH, aumentos > 20 x 10 ⁹ /L leucocitos, 17p-, 11q-
Ibrahim <i>et al</i> (46)	150	LLC todos los estadios	2001	SG	Rai, Hb, B2M, CD38	Hb, CD38
Del Poeta <i>et al</i> (45)	168	LLC todos los estadios, no tratados	2001	SG	Rai, B2M, CD38, CD23 soluble, bcl-2*, CD95	CD38, CD23 soluble
Morabito <i>et al</i> (47)	113	LLC todos los estadios, no tratados	2001	SG	Edad, Rai, Binet, TTM*, CD38	CD38
Oscier <i>et al</i> (72)	205	LLC todos los estadios	2002	SG	Binet, sexo, 17p-, 11q-, cariotipo, CD38, morfología atípica, +12, 13q-, IgVH	Binet, 17p-, IgVH
Hamblin <i>et al</i> (52)	145	LLC todos los estadios	2002	SG	CD38, Binet, morfología atípica, +12, 13q-, enfermedad progresiva, IgVH	Binet, CD38, IgVH
Krober <i>et al</i> (25)	300	LLC todos los estadios	2002	SG	Edad, sexo, Binet, Rai, Hb, leucocitos, plaquetas, LDH, FA, EMG, número y tamaño de adenopatías, 13q-, +12, 11q-, 17p-, 6q-, CD38, IgVH	Edad, LDH, IgVH, 17p-, 11q- aumentos > 20 x 10 ⁹ /L leucocitos

*Bcl-2: B cell lymphoma genes 2; TTM: total tumour mass score, suma de la raíz cuadrada del nº de linfocitos en SP, del diámetro de la mayor adenopatía palpable en centímetros y de la EMG palpable en centímetros (85).

Tabla 19: Continuación.

Autores	n	Tipo de cohorte	Año	Supervivencia analizada	Variables analizadas	Variables significativas
Chevallier <i>et al</i> (51)	123	LLC todos los estadios	2002	SLE*	Binet, CD38, morfología atípica, 11q-, 17p-, +12	CD38
Tsimberidou <i>et al</i> (30)	1506	LLC todos los estadios, no tratados	2007	SG	Albumina, creatinina, edad, HMG, sexo, Hb, B2M, 17p-/6q-, linfocitos	Edad > 60, B2M, albumina, creatinina, Hb, 17p-/ 6q-
Wierda <i>et al</i> (31)	1617	LLC todos los estadios, no tratados	2007	SG	Edad, sexo, leucocitos, Rai, linfocitos, nº áreas ganglionares, Hb, plaquetas, B2M, albumina, FA, LDH, prolifocitos, % linfocitos en MO, celularidad en MO, HMG, EMG, IgA, tiempo desde el diagnostico	Edad < 50, sexo, B2M, linfocitos > 50 x 10 ⁹ /L, Rai, más de 3 áreas ganglionares
Muntañola <i>et al</i> (54)	140	LLC Rai 0	2007	THP*	Leucocitos, ZAP-70, LDH, % linfocitos en MO, TDL, categorías de FISH, adenopatías por TC	ZAP-70, adenopatías por TC
Morabito <i>et al</i> (50)	262	LLC Binet A	2009	TPT*	No especificadas en el estudio	CD38, ZAP-70, IgVH
Delgado <i>et al</i> (32)	303	LLC todos los estadios	2009	SLT	CD38, ZAP-70, IgVH, 17p-, 11q-, B2M, B2M ajustada*	ZAP-70, B2M ajustada, 11q-, 17p-

*SLE: supervivencia libre de evento; THP: tiempo hasta progresión; TPT: tiempo hasta el primer tratamiento; B2M ajustada por función renal.

Tabla 19: Continuación.

Autores	n	Tipo de cohorte	Año	Supervivencia analizada	VARIABLES ANALIZADAS	VARIABLES SIGNIFICATIVAS
Gentile <i>et al</i> (33)	222	LLC Binet A	2009	SLT	No especificadas en el estudio	CD38, B2M, IgVH
Rossi <i>et al</i> (82)	277	LBM + LLC Rai 0	2009	SLT	Linfocitos, IgVH, +12/11q-/17p-, CD38, ZAP-70	Linfocitos > 5 x 10 ⁹ /L, IgVH, +12/11q-/17p-
Letestu <i>et al</i> (17)	339	LLC Binet A	2010	SLP	No especificadas en el estudio	Linfocitosis > 13 x 10 ⁹ /L, TK, B2M, CD38
Zenz <i>et al</i> (86)	280	LLC todos los estadios y con criterios de tratamiento	2010	SLP	Edad, Binet, 11q-, 17p-, IgVH, TP53, tipo de tratamiento	11q-, TP53, tratamiento con FC*
Wierda <i>et al</i> (27)	687	LLC todos los estadios, no tratados	2011	TPT	Edad, sexo, linfocitos, Hb, plaquetas, B2M, LDH, creatinina, albumina, % linfocitos en MO, IgA, IgG, IgM, tamaño del bazo, hígado y adenopatías, tiempo entre diagnóstico-tratamiento, Rai, n ^o áreas ganglionares, ECOG, categorías de FISH, cariotipo, IgVH, CD38, ZAP-70	linfocitos B > 10 x 10 ⁹ /L, linfocitos B > 5 x 10 ⁹ /L, IgVH, CD38, 11q-, 17p-
Scarfo <i>et al</i> (19)	684	LBM + LLC Rai 0	2012	SLT	LDH, más de 3 áreas ganglionares, tamaño de adenopatías cervicales, 17p-, 11q-, IgVH	IgVH, linfocitos B > 10 x 10 ⁹ /L

*FC: fludarabina + ciclofosfamida

Tabla 19: Continuación.

Autores	n	Tipo de cohorte	Año	Supervivencia analizada	Variables analizadas	Variables significativas
Baliakas <i>et al</i> (66)	1001	LLC todos los estadios, no tratados	2014	TPT	Binet, CD38, cariotipo complejo, 13q-, 11q-, 17p-, IgVH	Binet, cariotipo complejo, IgVH
Pflug <i>et al</i> (73)	1223	LLC todos los estadios, no tratados pero con criterios de tratamiento	2014	SG	Sexo, tiempo desde el diagnóstico, edad, síntomas B, Binet, Rai, ECOG, IgVH, categorías de FISH, Hb, plaquetas, leucocitos, linfocitos, neutrófilos, LDH, TK, B2M	Sexo, edad, ECOG, B2M, TK, 11q-, 17p-, IgVH
Stilgenbauer <i>et al</i> (87)	497	LLC todos los estadios, no tratados pero con criterios de tratamiento	2014	SLP	Edad, sexo, tipo de tratamiento, estadio, ECOG, escala CRF, síntomas B, leucocitos, TK, B2M, categorías de FISH, IgVH, TP53, SF3B1, NOTCH1	Tratamiento con FCR*, TK, 11q-, 17p-, IgVH, TP53, SF3B1
Baliakas <i>et al</i> (88)	774	LLC Binet A	2015	TPT	Edad, sexo, IgVH, 11q-, 13q-, +12, MYD88, BIRC3, SF3B1, NOTCH1, TP53 +/- 17p-	SF3B1, TP53, 11q-, IgVH

*FCR: fludarabina + ciclofosfamida + rituximab

Tabla 20: Resumen de los principales estudios prospectivos de factores pronósticos en LLC de 1990 a 2015, que incluyen análisis multivariante.

Autores	n	Tipo de cohorte	Año	Supervivencia analizada	Variables analizadas	Variables significativas	objetivo principal
Gentile <i>et al</i> (48)	146	LLC Rai 0	2005	SLT	No especificadas en el estudio	Edad > 65, sexo masculino, linfocitos > 30 x 10 ⁹ /L, CD38	Analizar el papel pronóstico del CD38 y sus cambios durante la evolución de la enfermedad
Shanafelt <i>et al</i> (63)	159	LLC todos los estadios, no tratados	2006	SG	Edad, Rai, 11q-/17p-	Edad, Rai, 11q-/17p-	Analizar el papel pronóstico y la evolución clonal de las alteraciones por FISH en estadios iniciales de LLC
Hus <i>et al</i> (49)	217	LLC todos los estadios, no tratados	2008	SG	Rai, plaquetas, Hb, LDH, ZAP-70, CD38	Hb, ZAP-70, CD38	Analizar el papel pronóstico conjunto de CD38 y ZAP-70
Kern <i>et al</i> (89)	298	LBM	2012	TPT	IgVH, 11q-, translocaciones IgVH por CBA*	IgVH	Comparar factores pronósticos entre LBM y LLC
Molica <i>et al</i> (90)	322	LBM + LLC Rai 0	2015	TPT	CD38, ZAP-70, IgVH, 11q-, 17p-	IgVH	Analizar el papel pronóstico de variables biológicas en estadios iniciales de LLC.
Gentile <i>et al</i> (91)	112	LLC Rai 0	2016	TPT	B2M, TC anormal, CD38, ZAP-70, IgVH	TC anormal	Validar el papel pronóstico de la TC en pacientes con LLC Rai 0

*CBA: chromosome band analysis

Entre los estudios prospectivos, solo el de Molica *et al* tiene un diseño parecido al nuestro y analiza la misma población de pacientes con el objetivo de valorar factores pronósticos presentes en el momento del diagnóstico (90). Los demás fueron diseñados con otra finalidad pero los autores aprovecharon para analizar las variables pronosticas. En dos de los seis estudios prospectivos se incluyeron pacientes en todos los estadios de la enfermedad. De los cuatro que analizaron pacientes en estadios iniciales, tres incluyeron variables no disponibles en muchos centros, como el estado mutacional de la IgVH (89-91).

El estudio prospectivo de Molica *et al* se publicó en 2015, prácticamente en el mismo mes que el artículo correspondiente al trabajo 2 de nuestra serie prospectiva. Ambos estudios tienen bastantes similitudes. Los dos analizan factores pronósticos biológicos como la positividad para CD38 y ZAP-70 y las anomalías cromosómicas por FISH. Sin embargo, los autores italianos incluyeron el estado mutacional de la IgVH en el análisis multivariante y no estudiaron variables clásicas. Ellos también compararon las características entre los pacientes con LBM y con LLC Rai 0 y encontraron una mayor frecuencia de niveles elevados de B2M ($p<0.0001$) y de IgVH no mutada ($p=0.009$) en pacientes con LLC Rai 0. En el análisis multivariante, solo la IgVH no mutada presentó

impacto negativo en el tiempo hasta el primer tratamiento (TPT; $p < 0.0001$). Finalmente, el estudio también describió la relación entre el límite de $12 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales y un TPT más corto en los pacientes con LLC Rai 0 (90).

Hasta la actualidad no hay consenso sobre la forma adecuada de aplicar toda la información que hay publicada en la literatura sobre factores pronósticos en la toma de decisiones del manejo clínico de los pacientes con LLC en estadios iniciales. Se han hecho cuatro grandes propuestas de índices pronósticos pero todas ellas basadas en series retrospectivas aunque con una posterior validación prospectiva. Las principales limitaciones de todas ellas son, por una parte que se analizan pacientes en varios estadios de la enfermedad (dos de ellos incluso estudian los pacientes que ya cumplen criterios para tratamiento) y por otra incluyen el estado mutacional de la IgVH como una de las variables que puntúa en el *score*, por lo que no son ampliamente utilizados en la práctica clínica.

El primero de ellos se publicó en 2009 por Morabito *et al* (50). Se analizaron retrospectivamente 262 pacientes diagnosticados de LLC no tratados en varios estadios. El *score* pronóstico que propusieron se basó en la presencia de tres factores: positividad para CD38, positividad para ZAP-70 y estado no mutado de la IgVH. Se clasificaron los pacientes en tres grupos pronósticos en función de la presencia o no de las variables: ninguna (bajo riesgo de necesitar

tratamiento en un periodo de tres años), una (riesgo intermedio) o dos/tres (alto riesgo). En 2014, el mismo grupo pudo validar este índice pronóstico de forma prospectiva en una cohorte de 468 pacientes con estadio A de Binet (371 Rai 0 y 97 Rai 1-2). También los autores analizaron por separado los casos con estadio 0 de Rai y los casos de LBM y obtuvieron los mismos resultados. Como dato interesante, en la validación prospectiva la B2M elevada y la presencia de linfocitosis absoluta superior a $10 \times 10^9/L$, aunque no fueran variables del *score*, presentaron significación estadística para SLP en el análisis multivariante en los pacientes con LLC en estadio A de Binet, mientras variables biológicas como las alteraciones citogenéticas por FISH o más novedosas como la mutación de NOTCH1 no fueron significativas (92).

En 2011, Wierda *et al* analizaron una cohorte retrospectiva de 930 pacientes con LLC también en varios estadios y no tratados. Los autores propusieron una fórmula para calcular el riesgo de necesidad de tratamiento, basada en la presencia de las siguientes variables pronósticas: más de tres áreas ganglionares afectadas por exploración física, zona ganglionar cervical voluminosa, presencia de 11q- por FISH, presencia de 17p- por FISH, LDH elevada y estado no mutado de la IgVH. También este índice pronóstico fue validado posteriormente en 2013 de forma prospectiva en 328 pacientes con LLC en estadio A de Binet (93). Aunque incluye variables clásicas y

biológicas, se trata de una propuesta que requiere un cálculo basado en una fórmula que no es fácil de utilizar en la práctica clínica diaria.

En 2014, Pflug *et al* publicaron un estudio retrospectivo de 23 variables pronosticas en 1948 pacientes diagnosticados de LLC, todos ellos incluidos en ensayos clínicos fase III del grupo alemán de LLC. Estos autores encontraron correlación de las siguientes variables con la SG: sexo, edad, escala ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*, ver anexo 1), presencia de 11q-, presencia de 17p-, B2M elevada, TK elevada y el estado mutacional de la IgVH. En función del número de variables, algunas de ellas puntuando más que otras, se estratificaron los pacientes en cuatro grupos con diferentes SG (73). En la misma publicación, los autores presentaron los resultados de la validación externa prospectiva en una serie de 676 pacientes. El hecho de estudiar pacientes ya incluidos en ensayos clínicos, y por lo tanto, con criterios de tratamiento, limita la utilidad de este *score* en los estadios iniciales de la enfermedad. Además del estado mutacional de la IgVH, el análisis de la TK tampoco está disponible en la mayoría de laboratorios.

La cuarta propuesta de índice pronóstico es reciente y fue presentada en forma de comunicación oral en la 13ª Conferencia Internacional de Linfomas (ICML, Lugano) en junio de 2015. Se trata de un meta análisis de 26 factores pronósticos en casi 3500 pacientes de cinco países (Francia, Alemania, Estados Unidos, Reino Unido y Polonia) incluidos en ocho ensayos clínicos fase III y con una mediana de seguimiento de 80 meses (74). Tal como la propuesta de Pflug *et al*, también tiene la limitación de analizar pacientes aunque no tratados, ya con criterios de tratamiento. Otros puntos negativos del estudio son una mediana de edad de 61 años (más baja que la que corresponde a la mayoría de casos de LLC) y la necesidad de disponer del análisis del estado mutacional de la IgVH. Los autores proponen un índice pronóstico internacional en LLC (IPI-CLL) basado en el análisis multivariante de 1192 casos con las siguientes variables significativas para SG: edad (límite 65 años), estadio (Rai 0/Binet A vs Rai 1-4/Binet B-C), presencia de 17p- y/o mutación TP53, estado mutacional de la IgVH y B2M elevada. En función de los puntos, se estratificaron los pacientes en cuatro grupos con diferentes SG y posteriormente el modelo fue validado en una cohorte externa de 845 pacientes recién diagnosticados de LLC. La tabla 21 resume las principales características de las cuatro series descritas arriba.

Tabla 21: Resumen de las cuatro principales propuestas de índices pronósticos en LLC.

Estudio retrospectivo	Morabito <i>et al</i>	Wierda <i>et al</i>	Pflug <i>et al</i>	Bahlo <i>et al</i>
Año	2009	2011	2014	2015
n	262	930	1948	1192
Cohorte	Varios estadios no tratados	Varios estadios no tratados	Varios estadios con criterios de tratamiento	Varios estadios con criterios de tratamiento
Supervivencia analizada	SLT	SLT	SG	SG
Variables de mal pronóstico	CD38 ZAP-70 IgVH	Nº y localización ganglionares 11q- 17p- LDH IgVH	Sexo Edad ECOG 11q- 17p- B2M TK IgVH	Edad Estadio B2M 17p- y/o TP53 IgVH
Validación prospectiva				
Año	2014	2013	2014	2015
n	468	328	676	845
Tipo de paciente	Binet A	Binet A	Todos los estadios (57% Rai 0)	Todos los estadios

2. Valoración de las variables pronósticas

Discutiremos de forma individual las variables significativas en el análisis multivariante de los dos trabajos de nuestra serie: (A) presencia de adenopatías, (B) morfología linfocitaria atípica, (C) más de $11 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales al diagnóstico, (D) B2M elevada, (E) positividad para CD38 y (F) presencia de 11q- por FISH. También discutiremos la (G) presencia de 17p- por tener en nuestro trabajo un valor que casi alcanza la significación estadística.

2.1. Presencia de adenopatías al diagnóstico

Muntañola *et al* publicaron un estudio retrospectivo en el que describen que la presencia de adenopatías detectadas por TC al diagnóstico en pacientes estadiados como Rai 0 por exploración física, se correlaciona con la progresión de la enfermedad (riesgo relativo [RR] 2.71) (54). Un estudio prospectivo más reciente también describió la correlación entre una TC anormal y menos TPT en pacientes clínicamente clasificados como Rai 0. En este mismo estudio, la presencia de adenopatías por TC fue el único factor pronóstico con significación estadística en el análisis multivariante ($p=0.011$) (91). Todo ello es similar a los resultados de nuestro análisis prospectivo, que confirma que la presencia de adenopatías

por exploración física al diagnóstico se correlaciona con una peor SLP en estadios precoces de la LLC.

2.2. Morfología linfocitaria atípica

Pocos estudios han analizado el papel pronóstico de la morfología atípica de los linfocitos en la LLC, la gran mayoría de ellos son retrospectivos y publicados hace años. En el año 1997, Criel *et al* analizaron 390 pacientes con LLC y concluyeron que los estadios iniciales (Binet A/Rai 0) presentaban morfología típica con mayor frecuencia que los estadios avanzados (14). En el mismo año, Oscier *et al* describieron la correlación entre la morfología atípica y una SLP más corta (13). Los mismos autores, en 2002, encontraron una peor SG en pacientes con morfología linfocitaria atípica en el análisis univariante ($p < 0.001$) pero no en el multivariante en una serie retrospectiva de 205 pacientes con LLC de los cuales 169 tenían un estadio A de Binet (72). Resultados semejantes fueron descritos por Schwarz *et al* en 2006, que hacían énfasis en la necesidad de confirmación de los datos en estudios prospectivos (15). Los dos últimos estudios sugirieron una posible correlación entre la morfología atípica y el estado no mutado del IgVH. Con la descripción de nuevos marcadores moleculares en las últimas décadas ya no se han vuelto a publicar estudios sobre el valor de la morfología linfocitaria en LLC. Se trata de un hecho interesante que

se pueda validar de forma prospectiva el papel pronóstico de una herramienta tan barata y fácilmente disponible en la era de los marcadores genéticos y moleculares.

2.3. Número absoluto de linfocitos B clonales superior a $11 \times 10^9/L$

Molica *et al* describieron la correlación entre el valor de $10 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales y un TPT más corto y Scarfo *et al* correlacionaron el mismo valor con peor SLP y SLT mientras Shanafelt *et al* sugirieron el límite de $11 \times 10^9/L$ como el óptimo en predecir la SLT y la SG (16, 18, 19). Algunos estudios proponen un número más elevado de linfocitos absolutos (sin cuantificar los clonales) asociado con una peor SLP (13, 24, 31). Por otro lado, el único estudio que correlacionó el valor de $5 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales con una peor SLT en el análisis multivariante fue también retrospectivo. Estos autores estudiaron una cohorte de 277 pacientes (123 LBM + 154 LLC Rai 0) y, a parte de la cifra de linfocitos, también encontraron las alteraciones por FISH (+12, 11q- y 17p-) y la IgVH no mutada como variables significativas (82). También Morabito *et al* analizaron 329 casos de LCA y concluyeron que el valor de $5 \times 10^9/L$ era adecuado para discriminar grupos de pacientes con diferentes pronósticos pero únicamente cuando coexistían tres o más variables con impacto negativo en el mismo paciente (94). Sin embargo, se trata de un estudio que, aunque

prospectivo, no realizó análisis multivariante de los factores pronósticos y que fue diseñado con el objetivo de comparar datos biológicos y genéticos entre casos de LBM y de LLC Rai 0. Es posible que el valor utilizado actualmente para definir LBM no sea el óptimo y que la LBM y la LLC se traten de fases diferentes de la misma enfermedad. No parece clínicamente relevante establecer $5 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales como límite entre las dos entidades.

2.4. B2M elevada

La B2M elevada también se describió como factor de mal pronóstico en LLC en muchos estudios retrospectivos con pacientes en varios estadios de la enfermedad (29, 30, 33). Letestu *et al* estudiaron retrospectivamente 339 pacientes con LLC en estadio A de Binet y la B2M elevada fue una de las variables que se correlacionó con una peor SLP en el análisis multivariante (17). También Delgado *et al* publicaron un estudio de 458 pacientes con LLC de los cuales más del 70% eran estadios A de Binet y en el que los niveles elevados de B2M ajustados según el filtrado glomerular tuvieron un impacto negativo en el análisis multivariante para SLT (32). Finalmente, la B2M elevada fue una de las variables significativas para un TPT más corto en el análisis prospectivo realizado por Gentile *et al* en pacientes con LLC en estadio 0 de Rai, juntamente con una TC anormal y la positividad para CD38, aunque perdió el valor

pronóstico cuando los pacientes se reclasificaron según las guías de 2008 (4, 91).

2.5. Positividad para CD38

No hay muchos estudios sobre el papel del CD38 en fases precoces de la enfermedad. Chevallier *et al* analizaron retrospectivamente 123 pacientes con LLC y encontraron correlación significativa entre la positividad para CD38 y la supervivencia libre de evento y el intervalo libre de tratamiento ($p=0.002$ y $p=0.004$, respectivamente). Cuando estudiados por separado los casos en estadio A de Binet, el CD38 fue la única variable significativa en el análisis multivariante (51). En 2005, Gentile *et al* analizaron el valor pronóstico del CD38 en una cohorte prospectiva de pacientes con LLC (146 con estadio 0 de Rai). Aunque el objetivo del estudio era evaluar el cambio en la expresión de CD38 a lo largo de la evolución de la enfermedad, los autores encontraron una correlación entre una positividad de CD38 superior a un 7% por citometría de flujo y una peor SLT (*hazard ratio* [HR] 2.0, $p=0.03$) (48). Hus *et al* también describieron un análisis que incluyó 217 pacientes recién diagnosticados, de los cuales 50 en estadio 0 de Rai y 115 en estadios 1-2 y en los que la positividad para CD38 fue un factor pronóstico independiente en el análisis multivariante (HR 1.03, $p=0.002$) (49). Otros estudios también encontraron impacto pronóstico negativo en la positividad para

CD38 en análisis retrospectivos multivariantes (17, 33, 45-47, 50, 52) y univariantes (95, 96).

2.6. Delección 11q-

Estudios previos retrospectivos ya demostraron la asociación de la presencia de 11q- con enfermedad avanzada, afectación ganglionar extensa, un TPT más corto y una SLP inferior en LLC (24, 25, 27, 73, 84, 86, 97, 98). En estadios iniciales, sin embargo, la 11q- no tiene un papel pronóstico tan claro. Delgado *et al* describieron la correlación entre 11q- y 17p- con una SLT más corta en más de 300 pacientes en estadio A de Binet (32). En un estudio que comparó una serie de 298 casos de LBM seguida prospectivamente con 356 casos retrospectivos de LLC y más enfocado en variables biológicas y moleculares, Kern *et al* describieron la correlación de 11q- y +12 por FISH pero no de 17p- con un TPT más corto cuando se analizaban las dos cohortes juntas. Las alteraciones por FISH no influenciaron la supervivencia de los pacientes con LBM. Estos autores también incluyeron en el estudio análisis de bandas cromosómicas y del estado mutacional del IgVH pero ninguna variable clásica (89). Más recientemente, los investigadores del grupo ERIC (*European Research Initiative on CLL*) publicaron los resultados de un estudio de mutaciones y alteraciones genéticas en más de 3000 pacientes con LLC, 75% de ellos al diagnóstico y más de 90% no tratados. En 774

pacientes con estadio A de Binet, encontraron que la presencia de 11q- por FISH se correlacionó con un TPT más corto en el análisis multivariante, juntamente con estado no mutado de la IgVH y con la presencia de mutaciones de TP53 y de SF3B1 (88).

2.7. Delección 17p-

Estudios retrospectivos describieron el impacto negativo de 17p- en la supervivencia de pacientes con LLC en varios estadios (24, 25, 27, 30, 32, 72, 73, 82, 83, 87, 99) y en la respuesta a los tratamientos convencionales (83, 100, 101). Un estudio prospectivo analizó las alteraciones cromosómicas por FISH en una cohorte de 159 pacientes con LLC, de los cuales solo 96 fueron incluidos con menos de un año de diagnóstico de la enfermedad. Con una mediana de seguimiento de 8.4 años, los autores estudiaron básicamente pacientes con estadios iniciales (83% de los casos eran Rai 0-1) y concluyeron que la presencia de 11q- y 17p- (grupo con FISH de mal pronóstico) se correlacionó con una peor SG cuando comparados a una FISH normal o la presencia de 13q- o +12 (grupo con FISH de pronóstico intermedio o bueno) ($p=0.003$) (63). El principal objetivo de este estudio fue sin embargo, analizar la aparición de nuevas anomalías citogenéticas durante la evolución de la LLC. Los autores confirmaron este fenómeno, casi siempre la adquisición de 11q- y 17p-, lo que hace más interesante evaluar el real papel pronóstico de

estas alteraciones en muestras recogidas al diagnóstico y sobre todo en los estadios iniciales.

En resumen, muy pocos trabajos estudian variables pronosticas en estadios precoces de LLC de forma prospectiva. En nuestro estudio, los pacientes en estadios muy precoces tienen un peor pronóstico si presentan al diagnóstico más de $11 \times 10^9/L$ linfocitos B monoclonales, morfología linfocitaria atípica, niveles séricos elevados de B2M y delección 11q- por FISH. En los pacientes con enfermedad algo más avanzada, la expresión de CD38 al diagnóstico tiene un impacto negativo en la SLP. En aquellos pacientes que ya presentan adenopatías patológicas al diagnóstico, la afectación ganglionar es el factor pronóstico más potente para predecir la progresión de la enfermedad.

La identificación de variables pronosticas al diagnóstico en pacientes con linfocitosis B clonal pero sin signos o síntomas de enfermedad puede permitir seleccionar un subgrupo que se beneficiaría de un tratamiento precoz y poco tóxico. En la práctica clínica, no se dispone habitualmente de técnicas complejas de laboratorio por lo que es importante que estas variables puedan obtenerse con facilidad.

CONCLUSIONES

Trabajo 1

1. En estadios de Rai 0-1 de la LLC, la presencia de adenopatías al diagnóstico por exploración física es el único factor pronóstico significativo para progresión de la enfermedad, siendo más potente que cualquier característica biológica de la célula de la LLC.
2. En estadios de Rai 0, cuando solo se analizan variables biológicas, la expresión de CD38 por citometría de flujo es el único factor pronóstico significativo para la progresión. La presencia de 17p- por FISH, poco frecuente en estos pacientes, casi alcanza significación estadística para SLP.

Trabajo 2

1. Los pacientes con LBM y con estadios Rai 0 de la LLC (pacientes con LCA) tienen la misma enfermedad en diferentes fases evolutivas.
2. Los pacientes con LCA que tienen una morfología atípica de los linfocitos y la B2M elevada al diagnóstico tienen una SLT

significativamente más corta. La morfología linfocitaria atípica al diagnóstico también tiene impacto negativo en la SLP de estos pacientes.

3. Los pacientes con LCA con menos cantidad de linfocitos B clonales presentan menos alteraciones citogenéticas. La presencia de 11q- por FISH aumenta el riesgo de progresión y necesidad de tratamiento en estos pacientes.

4. Los pacientes con LCA que tienen más de $11 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales tienen un riesgo significativamente más elevado de progresar y necesitar tratamiento. La cifra de $11 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales identifica dos grupos de pacientes con diferente evolución, lo que no sucede con el valor arbitrario de $5 \times 10^9/L$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 1995; 333: 1052-7.
2. Salar A, Fernández de Sevilla A, Romagosa V *et al.* Distribution and incidence rates of lymphoid neoplasms according to the REAL classification in a single institution. A prospective study of 940 cases. *Eur J Haematol.* 1997; 59: 231-7.
3. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla M *et al.* The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia.* 1994; 8: 1640-5.
4. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the international Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008; 111: 5446-56.
5. Molica S, Levato D. What is changing in the natural history of chronic lymphocytic leukemia? *Haematol.* 2001; 86: 8-12.
6. 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: 4990-7.
7. Shustik C, Mick R, Silver R *et al.* Treatment of early chronic lymphocytic leukemia: intermittent chlorambucil versus observation. *Hematol Oncol.* 1988; 6: 7-12.

8. CLL Trialists' Collaborative Group. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 861-8.
9. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP *et al.* Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975; 46: 219-234.
10. Binet JL, Auquier A, Dighiero G *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 1981; 48: 198-206.
11. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT *et al.* Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol.* 1989; 42: 567-84.
12. Vallespí T, Montserrat E, Sanz MA. Chronic lymphocytic leukaemia: prognostic value of lymphocyte morphological subtypes. A multivariate survival analysis in 146 patients. *Br J Haematol.* 1991; 77: 478-85.
13. Oscier DG, Matutes E, Copplestone A *et al.* Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progresión in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol.* 1997; 98: 934-9.
14. Criel A, Verhoef G, Vlietinck R *et al.* Further characterization of morphologically defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases. *Br J Haematol.* 1997; 97: 383-91.
15. Schwarz J, Mikulenkova D, Cermakova K *et al.* Prognostic relevance of the FAB morphological criteria in chronic lymphocytic leukemia: correlations with IgVh gene mutational status and other prognostic markers. *Neoplasma.* 2006; 53: 219-25.

16. 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*. 2009; 113: 4188-96.
17. Letestu R, Lévy V, Eclache V *et al.* Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood*. 2010; 116: 4588-90.
18. Molica S, Mauro FR, Giannarelli D *et al.* Differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-lymphocytosis according to clinical outcome: on behalf of GIMEMA chronic lymphoproliferative diseases working group. *Hematologica*. 2011; 96: 277-83.
19. Scarfò L, Zibellini S, Tedeschi A *et al.* Impact of B-cell count and imaging screening in cMBL: any need to revise the current guidelines? *Leukemia*. 2012; 26: 1703-7.
20. Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Viñolas N *et al.* Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol*. 1986; 62: 567-75.
21. Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1987; 60: 2712-6.
22. Petrelli F, Cabiddu M, Coinu A *et al.* Prognostic role of lactate dehydrogenase in solid tumors: a systematic review and meta-analysis of 76 studies. *Acta Oncol*. 2015; 54: 961-70.
23. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM *et al.* Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood*. 1987; 69: 929-36.
24. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1910-6.

25. Krober A, Seiler T, Benner A *et al.* Vh mutational status, CD38 expression level, genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002; 100: 1410-6.
26. Rossi D, Cerri M, Capello D *et al.* Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol.* 2008; 142: 202-15.
27. Wierda WG, O'Brien S, Wang X *et al.* Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 4088-95.
28. Simonsson B, Wibell L, Nilsson K. Beta 2-microglobulin in chronic lymphocytic leukaemia. *Scand J Haematol.* 1980; 24: 174-80.
29. Hallek M, Wanders L, Ostwald M *et al.* Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma.* 1996; 22: 439-47.
30. Tsimberidou AM, Wen S, O'Brien S *et al.* Assessment of chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma by absolute lymphocyte counts in 2,126 patients: 20 years of experience at the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 4648-56.
31. Wierda WG, O'Brien S, Wang X *et al.* Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2007; 109: 4679-85.
32. Delgado J, Pratt G, Phillips N *et al.* Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *Br J Haematol.* 2009; 145: 801-5.

33. Gentile M, Cutrona G, Neri A *et al.* Predictive value of B2-microglobulin (B2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica*. 2009; 94: 887-8.
34. Hallek M, Wanders L, Strohmeyer S *et al.* Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann Hematol*. 1992; 65: 1-5.
35. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C *et al.* Elevated serum thymidine kinase Levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 93: 1732-7.
36. Sarfati M, Chevret S, Chastang C *et al.* Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996; 88: 4259-64.
37. Reinisch W, Willheim M, Hilgarth M *et al.* Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 1994; 12: 2146-52.
38. Lipshutz MD, Mir R, Rai KR *et al.* Bone marrow biopsy and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1980; 46: 1422-7.
39. Rozman C, Montserrat E, Rodríguez-Fernández JM *et al.* Bone marrow histologic pattern – the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood*. 1984; 64: 642-8.
40. Han T, Barcos M, Emrich L *et al.* Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia: correlations with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic data. *J Clin Oncol*. 1984; 2: 562-70.
41. Mauro FR, De Rossi G, Burgio VL *et al.* Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335

- untreated cases from a single institution. *Haematologica*. 1994; 79: 334-41.
42. Geisler CH, Hou-Jensen K, Jensen OM *et al*. The bone-marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is not an important prognostic factor. Danish CLL Study Group. *Eur J Haematol*. 1996; 57: 292-300.
 43. Kumagai M, Coustan-Smith E, Murray DJ *et al*. Ligation of CD38 suppresses human B lymphopoiesis. *J Exp Med*. 1995; 181: 1101-10.
 44. Deaglio S, Mehta K, Malavasi F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk Res*. 2001; 25: 1-12.
 45. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A *et al*. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001; 98: 2633-9
 46. Ibrahim S, Keating M, Do KA *et al*. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001; 98: 181-6.
 47. Morabito F, Mangiola M, Oliva B *et al*. Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2001; 25: 927-32.
 48. Gentile M, Mauro FR, Calabrese E *et al*. The prognostic value of CD38 expression in chronic lymphocytic leukaemia patients studied prospectively at diagnosis: a single institute experience. *Br J Haematol*. 2005; 130: 549-57.
 49. Hus I, Bojarska-Junak A, Dmoszyńska A *et al*. ZAP-70 and CD38 expression are independent prognostic factors in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia and combined analysis improves their predictive value. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008; 46: 147-52.
 50. Morabito F, Cutrona G, Gentile M *et al*. Definition of progression risk based on combinations of cellular and molecular markers in

- patients with Binet stage A chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2009; 146: 44-53.
51. Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H *et al.* CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2002; 116: 142-50.
 52. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE *et al.* CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood.* 2002; 99: 1023-9.
 53. Crespo M, Bosch F, Villamor N *et al.* ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin variable region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1764-75.
 54. Muntañola A, Bosch F, Arguis P *et al.* Abdominal computed tomography predicts progression in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 1576-80.
 55. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z *et al.* ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet.* 2004; 363: 105-11.
 56. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL *et al.* ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2004; 351: 893-901.
 57. Best OG, Ibbotson RE, Parker AE *et al.* ZAP-70 by flow cytometry: a comparison of different antibodies, anticoagulants, and methods of analysis. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006; 70: 235-41.
 58. Chaar BT, Schergen AK, Grosso LE. Discordance of ZAP-70 in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol.* 2008; 30: 36-40.

59. Morabito F, Cutrona G, Gentile M *et al.* Is ZAP70 still a key prognostic factor in early stage chronic lymphocytic leukaemia? Results of the analysis from a prospective multicentre observational study. *Br J Haematol.* 2015; 168: 455-9.
60. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 399-408.
61. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M *et al.* Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med.* 1990; 323: 720-4.
62. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF *et al.* Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol.* 2003; 121: 287-95.
63. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR *et al.* Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 4634-41.
64. Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y *et al.* Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood.* 2012; 119: 3668-83.
65. Austen B, Powell JE, Alvi A *et al.* Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood.* 2005; 106: 3175-82.
66. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A *et al.* Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol.* 2014; 89: 249-55.

67. Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S *et al.* Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood*. 2012; 119: 2310-3.
68. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L *et al.* Clonal evolution in chronic lymphocytic leukaemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy and short survival. *Haematologica* 2007; 92: 1242-5.
69. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998; 102: 1515-25.
70. Damle RN, Wasil T, Fais F *et al.* IgV gene mutation and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94: 1840-7.
71. Hamblin TJ, Davis G, Gardiner A *et al.* Unmutated immunoglobulin VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94: 1848-54.
72. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ *et al.* Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*. 2002; 100: 1177-84.
73. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD *et al.* Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014; 124: 49-62.
74. Bahlo J, Kutsch N, Bergmann M *et al.* The international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI) – an international meta-analysis. *Hematol Oncol*. 2015; 33: 127-8.

75. Puente XS, Pinyol M, Quesada V *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011; 475: 101-5.
76. 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; 29: 2223-9.
77. Rose-Zerilli MJ, Forster J, Parker H *et al.* ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica*. 2014; 99: 736-42.
78. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N *et al.* The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood*. 2013; 121: 468-75.
79. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LL. *ISCN 2009: An international system for human cytogenetic nomenclature*. Basel: Karger AG; 2009.
80. Fiegl M, Erdel M, Tinhofer I *et al.* Clinical outcome of pretreated B-cell chronic lymphocytic leukemia following alemtuzumab therapy: a retrospective study on various cytogenetic risk categories. *Ann Oncol*. 2010; 21: 2410-19.
81. Heagerty PJ, Lumley T, Pepe MS. Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker. *Biometrics*. 2000; 56: 337-44.
82. Rossi D, Sozzi E, Puma A *et al.* The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br J Haematol*. 2009; 146: 64-75.

83. Döhner H, Fischer K, Bentz M *et al.* p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogues in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood*. 1995; 85: 1580-9.
84. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR *et al.* 11q deletions identify a new subset of B-chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997; 89: 2516-22.
85. Jaksic B, Vitale B. Total tumour mass score (TTM): a new parameter in chronic lymphocyte leukaemia. *Br J Haematol*. 1981; 49: 405-13.
86. Zenz T, Eichhorst B, Busch R *et al.* TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 4473-9.
87. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P *et al.* Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014; 123: 3247-54.
88. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA *et al.* European Research Initiative on CLL (ERIC). Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015; 29: 329-36.
89. Kern W, Bacher U, Haferlach C *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis is closely related to chronic lymphocytic leukaemia and may be better classified as early-stage CLL. *Br J Haematol*. 2012; 157: 86-96.
90. Molica S, Giannarelli D, Levato L *et al.* Do biologic parameters affect the time to first treatment of clinical monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia Rai stage 0? Results of a prospective analysis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015; 15: 55-60.
91. Gentile M, Cutrona G, Molica S *et al.* Prospective validation of predictive value of abdominal computed tomography scan on time to first treatment in Rai 0 chronic lymphocytic leukemia patients:

- results of the multicenter O-CLL1-GISL study. *Eur J Haematol.* 2016; 96: 36-45.
92. Gentile M, Cutrona G, Mosca L *et al.* Prospective validation of a risk score based on biological markers for predicting progression free survival in Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: results of the multicenter O-CLL1-GISL study. *Am J Hematol.* 2014; 89: 743-50.
93. Molica S, Giannarelli D, Gentile M *et al.* External validation on a prospective basis of a nomogram for predicting the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2013; 119: 1177-85.
94. Morabito F, Mosca L, Cutrona G *et al.* Clinical monoclonal B lymphocytosis versus Rai 0 chronic lymphocytic leukemia: A comparison of cellular, cytogenetic, molecular, and clinical features. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 5890-900.
95. Domingo-Domènech E, Domingo-Claros A, González-Barca E *et al.* CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. *Haematologica.* 2002; 87:1021-7.
96. Durig J, Naschar M, Schmucker U *et al.* CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia.* 2002; 16, 30-5.
97. Neilson JR, Auer R, White D *et al.* Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia.* 1997; 11: 1929-32.
98. Dickinson JD, Smith LM, Sanger WG *et al.* Unique gene expression and clinical characteristics are associated with the 11q23 deletion in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2005; 128: 460-71.

99. Delgado J, Espinet B, Oliveira AC *et al.* Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica; Grupo Español de Citogenética Hematológica. Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *Br J Haematol.* 2012; 157: 67-74.
100. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G *et al.* International Group of Investigators; German Chronic Lymphocytic Leukaemia Study Group. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2010; 376: 1164-74.
101. 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; 29: 2223-9.
102. Sørensen JB, Klee M, Palshof T *et al.* Performance status assessment in cancer patients. An inter-observer variability study. *Br J Cancer.* 1993; 67: 773-5.
103. Mor V, Laliberte L, Morris JN *et al.* The Karnofsky performance status scale. An examination of its reliability and validity in a research setting. *Cancer.* 1984; 53: 2002-7.

ANEXOS

Anexo 1. Escala ECOG para valoración del estado funcional (102):

ECOG	
0	Totalmente activo y capaz de realizar todas las actividades previas a la enfermedad sin ninguna restricción.
1	Restricciones para aquellas actividades que resulten físicamente extenuantes, pero ambulatorio y capaz de realizar trabajos de naturaleza ligera o sedentaria.
2	Ambulatorio y capaz de ocuparse de su cuidado personal, pero incapaz de realizar ningún tipo de actividad laboral. Pasa levantado más del 50% del tiempo que está despierto.
3	Capaz únicamente de ocuparse de cuidados personales limitados, y confinado en cama o en silla durante más de la mitad del tiempo que está despierto.
4	Completamente incapacitado. No puede ocuparse de ningún tipo de cuidado personal. Completamente confinado a la cama o a la silla.
5	Fallecido.

Anexo 2. Escala de Karnofsky para valoración del estado funcional (103):

Karnofsky	
100	Normal. No presenta síntomas. Sin evidencia de enfermedad.
90	Puede desarrollar una actividad normal. Mínimos síntomas o signos de enfermedad.
80	Desarrolla una actividad normal con esfuerzo. Se aprecian signos o síntomas de enfermedad.
70	Capaz de ocuparse de los cuidados personales. No se puede valer solo para desarrollar una actividad normal o realizar un trabajo activo.
60	Necesita ayuda esporádica pero puede ocuparse por sí mismo de la mayoría de sus necesidades.
50	Necesita ayuda en una medida considerable y atención médica frecuente.
40	Discapacitado. Necesita asistencia y cuidados especiales.
30	Gravemente discapacitado. Se propone hospitalización. El fallecimiento no es inminente.
20	Muy enfermo. Hospitalización necesaria. Tratamiento de soporte necesario.
10	Moribundo.
0	Defunción.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por todo. Y por no consentir que desistiera de *“fazer a residência em Barcelona”*.

A Joni, por hacer que me quisiera quedar y con ese enorme paso empezara de verdad nuestra historia. Por esos (ya más de) 10 años. Y por el tiempo de los cuatro juntos que me has regalado para que este trabajo fuese posible.

A Victor y Daniel, sin palabras.

A Juani y Justo, por estar siempre al pie del cañón.

A Dr. Marcos Leão, por haber plantado la semilla de querer ser Hematóloga desde su primera clase, en mi tercer año de carrera.

A Dr. Alberto Fernández de Sevilla y a Dra. Alicia Domingo, por la idea original de todo el proyecto y por haberme puesto en el camino de la LLC.

A todos mis compañeros de Hematología del ICO. A los que siguen, a los que ahora están en otros Servicios, a los que ya no están y a los que han venido hace menos. Por todo lo aprendido y lo compartido.

A Eva Domingo, por las horas buenas dentro y fuera del ambiente de trabajo. Por las horas malas, que también enseñan. Por el empujón que me faltaba desde aquella comida en Lugano.

Al “equipo” de hematólogos de nuestra Unidad Funcional de Linfomas y a Carmen Aguilera. A los que nos han ayudado con los

consentimientos y a los que llevan muchos de los 307 pacientes aquí analizados.

A Anna Sureda por el apoyo en los últimos meses

A los compañeros de Citología Especial de Bellvitge.

Al personal del Laboratorio de Citogenética del Hospital del Mar, donde aprendí lo que sé de FISH. A todos del Laboratorio de Citogenética del Hospital Germans Trias i Pujol y de Anatomía Patológica del HUB.

A Esme, Fina, Maite, Isabel y Eduard por las fotos y revisiones.

A Toni Asensio por siempre ponerlo fácil cuando he necesitado tiempo.

A Cristina, imprescindible en la recta final. Por trabajar tan bien y no parar mientras no quede perfecto.

A Dr. Albert Grañena, por su ayuda muy al principio.

A los pacientes incluidos en este estudio.

A todas y cada una de las personas que contribuyeron de alguna forma en la realización de este trabajo.

A Eva González por guiarlo todo. Por las ideas, los comentarios, las críticas, el sentido común, la seriedad, la objetividad y el buen trabajo. Por haberme enseñado a escribir un artículo. Por haberme enseñado muchísimo de LLC.

