



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA



**NUEVOS MARCADORES BIOLÓGICOS PARA EL
DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LA LEUCEMIA
LINFÁTICA CRÓNICA**

TESIS DOCTORAL

Alba Mora Raya

Barcelona 2019

SERVICIO DE HEMATOLOGÍA
HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU- IIB SANT PAU-UAB

**NUEVOS MARCADORES BIOLÓGICOS PARA EL
DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LA LEUCEMIA
LINFÁTICA CRÓNICA**

TESIS DOCTORAL

Alba Mora Raya,

Investigador predoctoral,

Laboratorio de Hematología Oncológica y Trasplantes,

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Carolina Moreno Atanasio,

Consultor médico,

Departamento de Hematología,

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

TUTOR DE TESIS

Dr. Jorge Sierra Gil,

Jefe de Servicio,

Departamento de Hematología,

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

ABREVIATURAS

LLC: Leucemia Linfática Crónica

SLPC-B: Síndromes Linfoproliferativos Crónicos de Células B

SmIg: *Surface Membrane Immunoglobulin*

CLL: *Chronic Lymphocytic Leucemia*

B-CLPD: *B-cell Chronic Lymphoproliferative disorders*

κ: Kappa

λ: Lambda

NCI: *National Cancer Institute*

SEER: *Surveillance, Epidemiology and End Results program*

BCR: *B-Cell Receptor*

NM-LLC: Leucemia Linfática Crónica No Mutada

M-LLC: Leucemia Linfática Crónica Mutada

Ig: Inmunoglobulina

SF3B1: *Splicing Factor 3b Subunit 1*

OMS: Organización Mundial de la Salud

FISH: *Fluorescent In Situ Hybridization*

del(13q14): Deleción del brazo largo del cromosoma 13 banda 1.4

miR: micro-RNA

+12: Trisomía 12

del(11q22-q23): Deleción del brazo largo del cromosoma 11 banda 2.2 y 2.3

ATM: Ataxia Teleangectasia Mutado

SG: Supervivencia global

BIRC3: *Baculoviral IAP Repeat Containing 3*

NFKB: *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

del(17p13): Delección del brazo corto del cromosoma 17 banda 1.3

TP53: *Tumor Protein 53*

IGHV: *Immunoglobulin Heavy Chain Variable Cluster*

IGLV: *Immunoglobulin Light Variable Cluster*

CDR3: *Complementary Determining Region 3*

AID: *Activation Induced Cytosine Deaminase*

RBI: Retinoblastoma

FBXW7: *F-box and WD repeat domain containing 7*

IWCLL: *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*

LPL: Leucemia Prolinfocítica

LBM: Linfocitosis B monoclonal

LCM: Linfoma de Células del Manto

LZM: Linfoma de la Zona Marginal

LEZM: Linfoma Esplénico de la Zona Marginal

LF: Linfoma Folicular

t(11;14)(q13;q32): Traslocación del brazo largo del cromosoma 11 banda 1.3 al brazo largo del cromosoma 14 banda 3.2

t(14;18)(q32;q21): Traslocación del cromosoma brazo largo del cromosoma 14 banda 3.2 al brazo largo del cromosoma 18 banda 2.1

LCP: Linfoma de Células Peludas

Annex A1: Annexina A1

DBA44: *Antibody raised against B cell centroblastic cell line*

BRAF V600: mutación V600E en el gen *BRAF*

del(17q32): Delección del brazo largo del cromosoma 17 banda 3.2

SOX11: gen de la familia de factores de transcripción “*SRY-related HMG-box*”

LLP: Linfoma Linfoplasmocítico

Hb: Hemoglobina

Plt: Plaquetas

β2M: Beta-2-microglobulina

HLA: *Human Leucocyte Antigen*

TK: Timidina Kinasa

SLT: Supervivencia Libre de Tratamiento

SLP: Supervivencia Libre de Progresión

FCR: Fludarabina-Cyclophosphamida-Rituximab

EMR: Enfermedad Mínima Residual

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PCRq: *Quantitative Polymerase Chain Reaction*

SLP: Supervivencia Libre de Progresión

EMA: *European Medicines Agency*

ERIC: *European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia*

MFIR: *Mean Fluorescence Intensity Ratio*

ESCCA: *European Society for Clinical Cell Analysis*

del(1q23): Delección del brazo largo del cromosoma 1 banda 2.3

del(13q14): Delección del brazo largo del cromosoma 13 banda 1.4

PBMCs: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

CART: *Chimeric Antigen Recetor T cells*

Th: *T helper cells*

ITIM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*

BTK: *Bruton Tyrosin Kinase*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
ÍNDICE.....	11
RESUMEN	15
SUMMARY	19
INTRODUCCIÓN.....	23
1. Aspectos generales de la leucemia linfática crónica	25
1.1 Definición.....	25
1.2 Epidemiología.....	25
2. Patología y biología de la leucemia linfática crónica.....	26
2.1 Etiología	26
2.2 Origen de la célula leucémica.....	28
3. Características de la célula leucémica	30
3.1 Morfología.....	30
3.2 Inmunofenotipo	31
3.3 Alteraciones moleculares.....	32
3.3.1 Deleción del brazo largo del cromosoma 13 (del(13q14)).....	33
3.3.2 Trisomía 12 (+12).....	33
3.3.3 Deleción del brazo largo del cromosoma 11 (del(11q22-q23)).....	33
3.3.4 Deleción del brazo corto del cromosoma 17 (del(17p13)).....	34
3.3.5 Receptor de células B	34
3.3.6 Otras mutaciones en la LLC	36
4. Diagnóstico y manejo clínico de la leucemia linfática crónica	36
4.1 Manifestaciones clínicas.....	36
4.2 Criterio diagnóstico según las guías IWCLL	37
4.3 Diagnóstico diferencial.....	38
4.3.1 Biopsia de ganglio linfático.....	40
4.3.2 Biopsia de bazo.....	41
4.3.3 Biopsia/aspirado de médula ósea.....	41
4.4 Factores pronósticos	41

5. Tratamiento de la Leucemia Linfática Crónica	48
5.1 Evaluación de la respuesta al tratamiento.....	49
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
ARTÍCULOS.....	55
Artículo 1. CD200 is a useful marker in the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia.	57
Artículo 2. FcγRIIb expression in early stage chronic lymphocytic leukemia.....	65
RESULTADOS GLOBALES	75
DISCUSIÓN GLOBAL.....	81
CONCLUSIONES.....	93
LÍNEAS DE TRABAJO FUTURO.....	97
Trabajos futuros con CD200	99
Trabajos futuros con FcγRIIb.....	101
BIBLIOGRAFÍA	105
ANEXOS	113

RESUMEN

La leucemia linfática crónica (LLC) es el tipo de neoplasia de célula B madura más frecuente en países occidentales. Su diagnóstico se basa en la detección de células leucémicas que presentan un patrón antigénico específico; sin embargo, existe un porcentaje de casos que presentan características atípicas, lo cual dificulta su diagnóstico. Por otra parte el curso clínico de la enfermedad es extremadamente heterogéneo y aunque se han identificado una gran variedad de marcadores clínicos y biológicos que permiten predecir de forma más precisa el curso clínico de los pacientes, sigue habiendo un gran interés en profundizar en la investigación en este campo ya que la gran mayoría de marcadores descritos no son realmente útiles en la práctica clínica bien porque no han llegado a ser estandarizados, carecen de significado biológico o son redundantes.

En la presente tesis se ha analizado la expresión de dos moléculas, CD200 y FcγRIIb, con el objetivo de discernir si, en primer lugar, CD200 podría permitir mejorar el diagnóstico de la LLC, en particular el de aquellos casos con LLC atípica; y en segundo lugar, explorar si el co-receptor FcγRIIb, que regula la activación del BCR, podría ser un marcador útil para predecir la evolución clínica de los pacientes con LLC.

En el primer estudio de esta tesis se evaluó la expresión de CD200 en síndromes linfoproliferativos crónicos de células B (SLPC-B) y se comparó su sensibilidad, especificidad y precisión con las obtenidas de los marcadores utilizados en clínica para establecer el diagnóstico de LLC; CD5, CD23, CD79b, FMC7 y la Inmunoglobulina de superficie (SmIg, por sus siglas en inglés). Los resultados demostraron que CD200 se expresaba con alta intensidad en la práctica totalidad de las células de LLC y de forma más débil en el resto de SLPC-B; no obstante, una pequeña proporción de casos de este último grupo mostraron expresión positiva del marcador. Además CD200 mostró alta sensibilidad y baja especificidad, pero su precisión para establecer el diagnóstico diferencial de la LLC fue equivalente al del resto de marcadores. Por otro lado, se analizó si la incorporación de

CD200 mejoraba la precisión del sistema de Matutes para establecer el diagnóstico diferencial y se observó que su inclusión mejoraba la clasificación de los pacientes de LLC incluso cuando era sustituido SmIg. Estos hallazgos demostraron que CD200 no es específico de la LLC, pero su combinación con CD5, CD23, CD79b y FMC7 contribuye a mejorar el diagnóstico de la enfermedad.

En el segundo estudio, se evaluó la expresión del receptor FcγRIIb en células leucémicas y se comparó su expresión con la obtenida en células B normales de donantes sanos. Las células leucémicas mostraron niveles de expresión de FcγRIIb similares a las células B normales de donantes sanos, aunque con un comportamiento intraclonal heterogéneo. Además se estudió la correlación de su expresión con los marcadores más comúnmente utilizados en clínica para estudiar el pronóstico de la enfermedad, y se analizó la relación entre los niveles de expresión del receptor y el tiempo de supervivencia libre de tratamiento (SLT) en pacientes de LLC no tratados. Los resultados mostraron que la expresión de FcγRIIb correlacionaba de forma débil con la expresión de CD49d y con una SLT más prolongada.

En conclusión, esta tesis contribuye al conocimiento de la expresión de CD200 y FcγRIIb en células leucémicas de pacientes en el momento del diagnóstico y/o en estadios tempranos de la enfermedad y pone de manifiesto la utilidad de CD200 para establecer el diagnóstico diferencial de esta enfermedad con otros SLPC-B y el valor pronóstico de la expresión FcγRIIb en los pacientes con LLC.

SUMMARY

Chronic Lymphocytic leukemia (CLL) is the most common mature B-cell neoplasm in Western Countries. The diagnosis of CLL is based on the detection of leukemic cells with a specific immunophenotype; nevertheless some cases present atypical features, which make the diagnostic process an intensive labor. The prognosis of CLL is extremely heterogeneous and although a high variety of molecular markers have been identified to predict the evolution of the disease, most of them have not been yet standardized because of the lack of reproducibility or biologic significance. This is the main reason why researchers are interested in gaining more insights into this issue.

In this thesis the expression of CD200 and Fc γ RIIb was analyzed in CLL cells to investigate; first, if CD200 allows to improve the diagnosis of CLL, and particularly in those cases with atypical CLL; second, to explore whether the co-receptor Fc γ RIIb, that regulates the activation of B-cell receptor, could be a useful marker to evaluate the prognosis of CLL patients in an accurate form.

In the first study of this thesis, the expression of CD200 was evaluated in patients with B-cell Chronic Lymphoproliferative disorders (B-CLPD) and the sensitivity, specificity and accuracy of this marker to establish the diagnosis of CLL was compared with those obtained from CD5, CD23, CD79b, FMC7 and surface membrane immunoglobulin (SmIg). The results showed that CD200 was expressed with high intensity in the whole CLL cell population, while other B-CLPD had lower intensity. However, there were a reduced number of other B-CLPD cases with positive expression of CD200. Moreover, CD200 had high sensitivity and low specificity, but the accuracy of this marker was similar to that obtained with other markers. In addition, we studied if CD200 added accuracy to Matutes Score and we observed that the substitution of SmIg by CD200 improved the CLL diagnosis. These results showed that CD200 is a valuable, albeit not

specific, CLL diagnostic marker and the combined use of CD200 with CD5, CD23, CD79b and FMC7 improved the accuracy of CLL disease.

The second study analyzed the expression of Fc γ RIIb expression on CLL cells, which was compared with the expression of this receptor on normal B-cells from healthy donors. Leukemic cells showed similar levels of Fc γ RIIb to normal B-cells, although this expression was heterogeneous on intraclonal leukemic cells. Moreover, we studied the association between expression of Fc γ RIIb and other prognostic markers and the correlation between Fc γ RIIb expression and disease outcome. Fc γ RIIb and CD49d expression showed low correlation, but no other associations were detected. However, patients with high Fc γ RIIb levels tend to have longer treatment free survival rates.

Overall, this thesis contributes to the knowledge of CD200 and Fc γ RIIb expression in CLL cells at diagnosis and/or in early stages of the disease, and points out the usefulness of these markers to establish the differential diagnosis of CLL with other B-CLPD and the prognostic value of Fc γ RIIb in CLL patients.

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales de la leucemia linfática crónica

1.1 Definición

La leucemia linfática crónica (LLC), también denominada leucemia linfoide crónica o linfocítica crónica, es un síndrome linfoproliferativo caracterizado por la acumulación progresiva de células B maduras que se encuentran en constante recirculación en sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides secundarios (ej. bazo, nódulos linfáticos o amígdalas) (1, 2); aunque en ocasiones pueden presentarse manifestaciones extranodales (ej. tracto genitourinario, intestinal, piel o sistema nervioso central) (3-6). Las células de LLC se caracterizan por presentar clonalidad de la cadena ligera restringida a kappa (κ) o lambda (λ) y co-expresar tanto antígenos de células B (i.e CD19 o CD23) como CD5, un marcador característico de células T. Sin embargo, poseen menor expresión de otros marcadores del linaje de células B como por ejemplo, CD20 y CD79b.

1.2 Epidemiología

La LLC es el tipo de leucemia más frecuente en adultos en los países occidentales, representando cerca del 1.3% de casos de cáncer y el 25% de casos de leucemia. Su ratio de incidencia es similar en Europa y Estados Unidos, con rangos entre 4 y 6 casos por cada 100.000 habitantes/año (7, 8). Sin embargo, este dato incrementa drásticamente con la edad llegando a manifestarse en más de 20 casos por cada 100.000 individuos mayores de 70 años (Figura 1) (9).

La edad media al diagnóstico es de 72 años (Figura 1). Además, hay una predisposición según el sexo, siendo más frecuente en hombres que en mujeres (ratio, 1.5-2:1) (Figura 2) (10, 11).

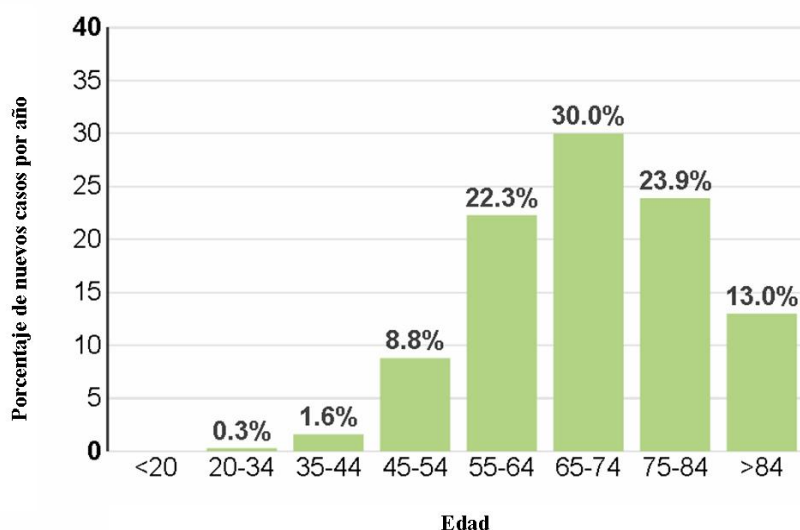


Figura 1. Incidencia de nuevos casos de LLC por rango de edad. Los valores corresponden a la base de datos de la SEER 21 2012-2016 ajustados por edad. Fuente: National Cancer Institute (NCI); Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program (9).

2. Patología y biología de la leucemia linfática crónica

2.1 Etiología

A pesar de los esfuerzos dedicados a identificar los factores que originan la LLC, en el momento actual se desconocen la causa o causas que originan la enfermedad.

Uno de los posibles factores que se ha postulado como factor determinante para el desarrollo de la LLC es la predisposición genética. La principal razón que apoya esta teoría es la baja incidencia de la enfermedad en personas de origen asiático (ej. China, Corea y Japón) (Figura 2), un dato que también se mantiene en la población emigrante y su descendencia (12). Además, los estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que la prevalencia de LLC es mayor en pacientes con antecedentes familiares de enfermedades hematológicas (ej. Linfoma no hodgkin); y que alrededor del 10% de los casos diagnosticados de LLC tienen en la familia dos o más individuos afectados por la misma enfermedad, con un perfil clínico y biológico similar a los casos diagnosticados de forma esporádica (13).

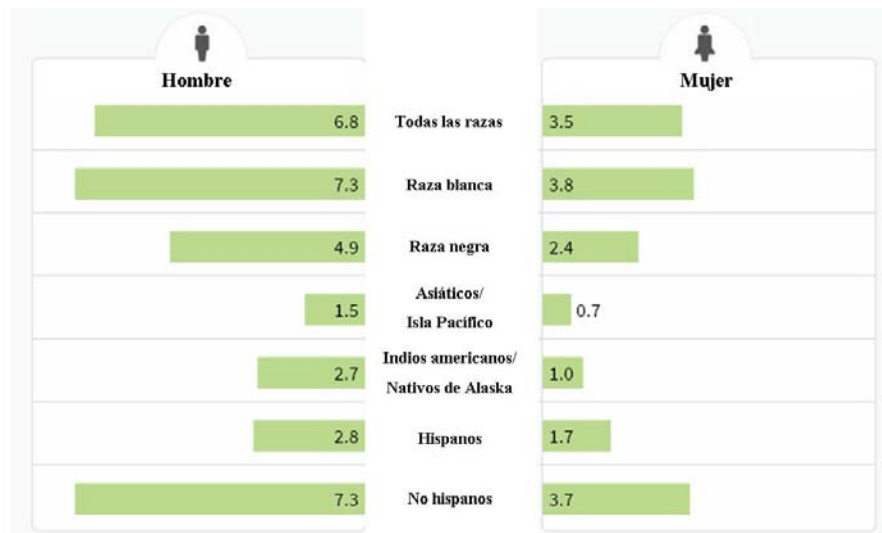


Figura 2. Número de nuevos casos de LLC por cada 100.000 personas. Los valores corresponden a la base de datos de la SEER 21 2012-2016, teniendo en cuenta la raza/etnia y el sexo. Fuente: National Cancer Institute (NCI); Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program (9).

El desarrollo de las técnicas de secuenciación y su aplicación en el campo de la LLC también apoya la teoría de una posible predisposición génica para el desarrollo de la enfermedad ya que se han identificado más de 20 loci que se encuentran activados de forma recurrente en pacientes diagnosticados de LLC (13). Cabe destacar que los genes presentes en estos loci participan en la activación de la célula B y particularmente en cascadas apoptóticas, unas de las principales vías de señalización más afectadas en la enfermedad (14).

Además de los factores genéticos, diferentes factores ambientales también han sido considerados como posibles agentes etiológicos del desarrollo de la enfermedad, ya que se ha descrito una asociación entre el diagnóstico de la LLC y la exposición a prolongada a procesos inflamatorios y autoantígenos, o la presencia de infecciones bacterianas y virales (12, 13, 15, 16).

2.2 Origen de la célula leucémica

Paralelamente muchos investigadores han tratado de explicar el proceso o procesos celulares que desembocan en la transformación a célula leucémica. En el pasado se consideraba que la LLC derivaba de una expansión anómala de las células naïve CD5⁺; sin embargo, más tarde se evidenció que la célula leucémica posee características de células B maduras que han estado en contacto con antígenos debido a que; expresa marcadores típicos que se encuentran en estadios celulares más avanzados (CD23, CD25, CD27, CD69 y CD71), tiene un perfil de expresión génica similar al de la célula memoria y presenta con frecuencia un mismo estereotipo de receptor de célula B (BCR, por sus siglas en inglés).

Durante el desarrollo de la célula B normal, el linfocito B naïve maduro IgM⁺IgD⁺ sale a circulación y migra a los centros germinales de ganglios linfáticos para sufrir procesos de hipermutación somática, cambio de isotipo y expansión clonal. Sin embargo, un fallo durante el desarrollo puede hacer que un clon escape antes de sufrir hipermutación somática y de lugar a un clon de LLC no mutada (NM-LLC) IgM⁺IgD⁺ (Ver sección “Receptor de célula B”), que madura de forma T independiente. Por el contrario, si la célula pasa por hipermutación somática pero evade el proceso de selección negativa, podrá derivar en un clon de LLC mutada (M-LLC), que sufrirá o no el cambio de isotipo hacia IgG⁺ y que madurará de forma T dependiente (17-21).

Sin embargo, es importante señalar que a pesar de que los clones de LLC mutada y no mutada poseen características biológicas propias, estudios de expresión génica han demostrado que ambas variantes poseen características genéticas comunes aunque diferentes a las del linfocito B normal. Es por ello que las últimas hipótesis apuntan a un fallo de tolerancia inmunológica en una etapa anterior del desarrollo, que haría que la célula de LLC sea capaz de escapar a los puntos de selección negativa (autoinmunidad) y

no responda de forma correcta ante la presencia de patógenos (inmunodeficiencia) (17, 18, 22-25).

A partir de una célula madre hematopoyética se generan en médula ósea grandes cantidades de linfocitos pro-B que están sometidos a un reordenamiento continuo de la cadena pesada de las Inmunoglobulinas (Igs). Según los últimos estudios, un fallo extrínseco o intrínseco a la célula en este punto afectaría al proceso de exclusión alélica y conduciría a la aparición del posible clon tumoral (18, 26), caracterizado por su constante edición del receptor de células B y por su capacidad para revertir su estado anérgico (27, 28). Las células pre-B de LLC generadas a partir de este proceso de maduración expresarían un BCR capaz de reconocer autoantígenos y de inducir señalización intracelular de forma autónoma. Así, la resistencia a mecanismos de tolerancia central como es la edición del receptor, induciría un proceso de selección positiva temprana y promovería la diferenciación, supervivencia y proliferación de un clon potencial de LLC. La capacidad de ese clon para entrar al centro germinal haría derivar la célula hacia LLC mutada o no mutada (Figura 3) (29).

A lo largo de estos puntos de control inmunológicos las células están sometidas de manera constante a reprogramaciones genéticas cuyas modificaciones epigenéticas o interacciones con determinantes antigénicos concretos podrían resultar tan agresivas para la célula, que conllevaría a la aparición de mutaciones somáticas puntuales o alteraciones moleculares responsables, al menos en parte, de la resistencia del clon de LLC a ser eliminado. De esta manera, se explicaría la aparición de mutaciones como MyD88, NOTCH-1 y SF3B1 o alteraciones cromosómicas como trisomía 12, delección 13q, delección 11q y delección 17p, ampliamente descritas en LLC (Ver sección “Características de la célula leucémica”) (30).

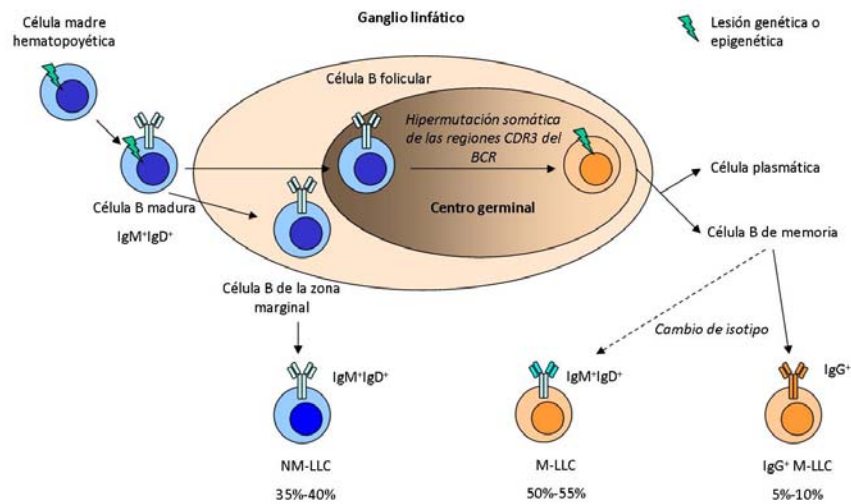


Figura 3. Teoría de desarrollo del clon tumoral de la Leucemia Linfática Crónica. Modificado de Ten Hacken E. Et al. Cancer Cell. 2017 (29).

3. Características de la célula leucémica

3.1 Morfología

La morfología de las células de LLC se estudia mediante frotis o extensión de sangre periférica. Las extensiones muestran un gran número de linfocitos de tamaño pequeño, de aspecto maduro, con un borde citoplasmático irregular y escaso citoplasma, un núcleo denso que carece de nucléolo y cromatina parcialmente condensada (31, 32). Es frecuente y característico de la enfermedad observar manchas celulares o sombras nucleares de Grumprecht, como consecuencia de la fragilidad de la membrana celular de los linfocitos durante la preparación de la extensión (Figura 4).

Además, en las preparaciones pueden encontrarse células más grandes o de apariencia atípica, intercaladas entre los linfocitos de LLC, en proporciones que oscilan entre el 15 y el 55% de las células linfoides. Estas células se denominan prolinfocitos, y se caracterizan por poseer un núcleo irregular, cromatina menos condensada, citoplasma abundante y un nucléolo central y prominente.

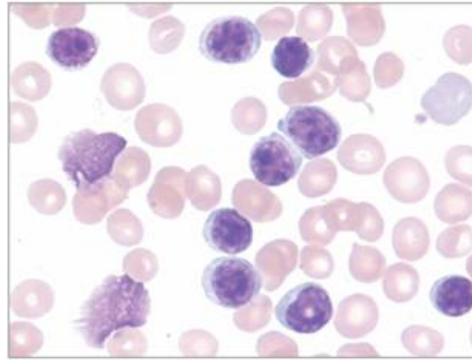


Figura 4. Linfocitos de leucemia linfática crónica de sangre periférica con borde definido, de pequeño tamaño y cromatina típicamente condensada (Wright-Giemsa, objetivo $\times 200$) (32).

3.2 Inmunofenotipo

El estudio inmunofenotípico en sangre periférica es necesario para realizar el diagnóstico de LLC (Ver sección “Diagnóstico y manejo clínico”). Las células de LLC son células B clonales, con restricción de la cadena ligera de la Ig, κ o λ , y se caracterizan por expresar niveles altos de marcadores de células B, CD19 y CD23 y de marcadores de células T, CD5 (Figura 5) (1, 33) .

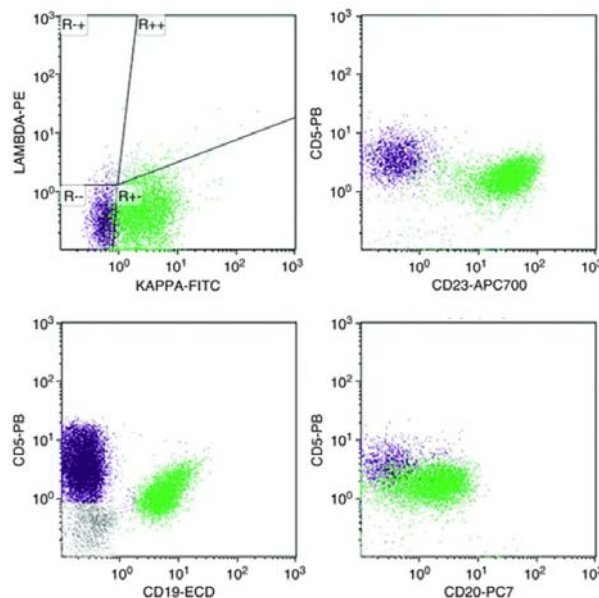


Figura 5. Inmunofenotipo clásico de las células de LLC por citometría de flujo. Las células de LLC (verde) muestran expresión débil de CD20 y expresión restringida para la cadena ligera κ (abajo y derecha). Además estas células son $CD19^+CD23^+$ y co-expresan CD5, aunque con menor intensidad que las células T (violeta). Modificado de Alikhan M.B. Et al. Neoplastic Diseases of the Blood (2018) (33).

Además estas células expresan niveles bajos de CD20, IgM/IgD y CD79b en comparación con las células B normales, y la expresión de CD10 y FMC7 suele ser negativa o muy débil.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) también incluye como características inmunofenotípicas de la LLC, la expresión positiva de CD43, CD81, CD200 y ROR1 y la expresión reducida de CD10, lo cual puede resultar de utilidad en casos con inmunofenotipo no concluyente (1).

Por otro lado, las células leucémicas de LLC muestran un inmunofenotipo de células B activadas, caracterizado por la alta expresión de los marcadores de activación CD25, CD69 y CD71 y la reducida expresión de moléculas que inhiben la activación celular como CD22, co-receptor Fc γ RIIb e IgD. Además, todas las células de LLC expresan CD27, un marcador característico de la subpoblación de células B de memoria (34).

3.3 Alteraciones moleculares

A diferencia de otras enfermedades linfoproliferativas, en las que existe un patrón genético característico, la LLC no se caracteriza por una alteración específica.

Tradicionalmente, los estudios genéticos en pacientes de LLC se evaluaban mediante técnicas de citogenética convencional como el bandeo de cromosomas o la tinción de Giemsa. Sin embargo, el bajo ratio mitótico de las células leucémicas sólo permitía la identificación de traslocaciones cromosómicas y cariotipos complejos en un reducido número de pacientes. En la actualidad, la combinación de nuevos mitógenos de células B y la tecnología de hibridación de fluorescencia in situ (FISH, por su siglas en inglés) han permitido identificar alteraciones genéticas en más del 80% de los casos de LLC; con ganancias o pérdidas de material genético en la mayoría de los casos y con presencia de traslocaciones en menor frecuencia (2, 35).

3.3.1 Delección del brazo largo del cromosoma 13 (*del(13q14)*)

Es la anomalía cromosómica más frecuente en la LLC, presentándose en el 50% de los casos. Esta delección afecta a dos micro-RNAs, miR-15a y miR16-1, cuyo clúster controla la producción de BCL-2, proteína anti-apoptótico que se expresa en altas cantidades en la LLC. Los modelos animales desarrollados con carencia de estos miRNA, experimentan un síndrome linfoproliferativo de tipo B, parecido al de LLC y algunos linfomas, lo cual sugiere que podría actuar como gen supresor de tumores y que su alteración jugaría un papel decisivo en el desarrollo de la célula leucémica de LLC (36).

3.3.2 Trisomía 12 (+12)

Esta alteración se detecta en un 10-20% de los casos de LLC. Está asociada a mutaciones en *NOTCH-1*, un gen que se expresa a lo largo del desarrollo de la célula B normal y en las células leucémicas, y codifica para una proteína transmembrana de clase I. Esta proteína actúa como ligando activador de factores de transcripción involucrados en la diferenciación celular, proliferación y apoptosis de la célula B.

3.3.3 Delección del brazo largo del cromosoma 11 (*del(11q22-q23)*)

Este tipo de alteración se encuentra en baja frecuencia en estadíos tempranos de la enfermedad, pero su frecuencia aumenta hasta un 20% en casos de LLC con enfermedad avanzada. Existen variaciones en cuanto al tamaño de la delección, pero en muchos casos la delección afecta al gen de ataxia-teleangectasia (*ATM*), y su deficiencia causa inestabilidad genómica. Además la delección está asociada a mutaciones en Splicing Factor 3b Subunit 1 (*SF3B1*, por sus siglas en inglés) (presente en un 5-7% de los casos al diagnóstico), un gen que regula el programa de splicing alternativo de genes que controlan el ciclo celular y la apoptosis. La detección de esta delección en pacientes con LLC se relaciona con presencia

de grandes masas adenopáticas, una progresión clínica rápida y en general, una menor supervivencia global (SG). Deleciones de gran tamaño incluyen también otros genes potencialmente relevantes como *BIRC3*, involucrado en la inhibición de la apoptosis y regulación de *NFKB*.

3.3.4 Delección del brazo corto del cromosoma 17 (del(17p13))

Esta delección es una alteración poco frecuente al diagnóstico (menos del 10% de los casos), pero su prevalencia aumenta durante el transcurso de la enfermedad y se presenta hasta en un 30% en casos refractarios. Además, el 80-90% de los casos que tienen del(17p) tienen mutación de *TP53* en otro alelo, provocando una inactivación completa de la vía de TP53.

Cabe destacar que la LLC presenta evolución clonal, según la cual, la clona predominante prolifera, pero co-existe con otras subclonas minoritarias que con el transcurso de la enfermedad y la presión ambiental (i.e. tratamiento con quimioterapia) pueden adquirir ventaja proliferativa e incrementar el número de alteraciones genéticas.

3.3.5 Receptor de células B

Si bien no existe una alteración genética específica de la LLC, sí se ha visto que el BCR juega un papel vital para determinar las características biológicas de la enfermedad, ya que es crucial para la supervivencia y el funcionamiento de la célula leucémica (37).

El BCR está formado por la recombinación aleatoria entre genes de la porción variable de la cadena pesada de la Ig (*IGHV*, por sus siglas en inglés) y de la porción variable de la cadena ligera de la Ig (*IGLV κ/λ* , por sus siglas en inglés), de manera que es difícil encontrar la misma estructura de BCR en células B normales. Sin embargo, es importante señalar que, a diferencia de lo que ocurre en las células B normales, al menos

un tercio de los pacientes diagnosticados de LLC tienen receptores derivados de la recombinación específica entre determinados genes V-D-J para la cadena pesada y V-J para la cadena ligera. Este tipo de reordenamientos que se producen con mayor frecuencia dentro de los pacientes de LLC, dan lugar a la aparición de BCRs estereotipados, con regiones complementarias CDR3, que por un lado permiten la clasificación en diferentes familias y por otro se asocian con diferente evolución de la enfermedad. Además, estos BCR estereotipados poseen sitios de unión al antígeno casi idénticos, lo cual apoya la teoría de que la unión recurrente de determinados epítomos está conectada con la selección de células B normales para inducir diferenciación hacia una célula de LLC.

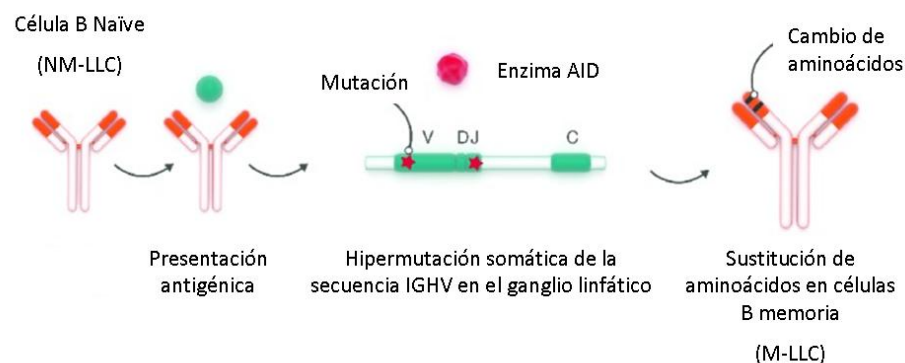


Figura 6. Generación de los subtipos mutado (M-LLC) y no mutado (NM-LLC) de células B en la leucemia linfática crónica. Modificado de Wiestner A. Haematologica. 2015 (38).

Una vez producida la recombinación de los genes que compondrán la cadena pesada y ligera, la célula puede entrar en procesos de hipermutación somática para aumentar la especificidad antigénica. En función del grado de hipermutación del gen IGHV los pacientes pueden ser clasificados como; NM-LLC, si tienen $\geq 98\%$ de homología con la secuencia germinal o M-LLC, si tienen $< 98\%$ de homología (Figura 6) (38). No obstante, la evolución hacia uno u otro subtipo de LLC parece ser más compleja y debe estar en parte dirigida por la selección antigénica (17, 39, 40).

Ambos grupos poseen diferentes comportamientos clínicos, lo cual puede estar determinado por las diferencias en el mecanismo de respuesta a señales externas. Las células de M-LLC son seleccionadas y expandidas por antígenos que inducen señales de alta afinidad, por eso los clones de estas células permanecen estables a lo largo del tiempo y se expanden a bajos ratios. Por el contrario, los pacientes con NM-LLC expresan BCRs polirreactivos de baja afinidad capaces de reconocer diferentes antígenos ambientales y autoantígenos presentes en el microambiente (39).

3.3.6 Otras mutaciones en la LLC

Aunque la mayoría de los genes localizados en las regiones cromosómicas son inactivados como consecuencia de las deleciones anteriormente comentadas; un tercio de los casos de LLC se ven afectados por la presencia de mutaciones puntuales o por pérdida de heterocigosidad. En este sentido, los estudios de secuenciación llevados a cabo en la LLC han permitido elaborar mapas mutacionales de la enfermedad, describiéndose hasta 44 genes afectados de manera recurrente por mutaciones y 11 genes afectados por variaciones recurrentes en el número de copias somáticas. Algunos de estos genes ya han sido comentados y descritos por su grado de participación en daño, reparación del DNA y control del ciclo celular (*ATM*, *TP53*, *RBI*, *BIRC3*), señalización de la vía NOTCH (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *FBXW7*), vías inflamatorias (*MYD88*, *KRAS*, *BRAF*), maquinaria del spliceosoma (*SF3B1*) y señalización de citoquinas (*NRAS*, *KRAS*, *BRAF*) (41, 42).

4. Diagnóstico y manejo clínico de la leucemia linfática crónica

4.1 Manifestaciones clínicas

El diagnóstico de LLC se suele realizar a partir de la práctica de un análisis de sangre periférica de rutina en el que se objetiva un incremento en el número de linfocitos, y la mayoría pacientes están asintomáticos en el momento del diagnóstico.

En algunos casos el paciente puede presentar linfadenopatías y/o esplenomegalia que son palpables durante un examen físico. Más allá, el paciente puede presentar de forma aislada, aunque poco frecuente, síntomas B tales como:

- Fiebre de origen desconocido mayor de 38°C durante dos o más semanas sin evidencias de infección
- Pérdida de peso de más de un 10% de manera no intencionada durante los 6 meses previos
- Sudoraciones nocturnas que se prolongan más de un mes sin evidencia de infección.

En estadios más avanzados de la enfermedad, el paciente suele mostrar astenia en el contexto de anemia, debido a infiltración de la médula ósea por células leucémicas, y/ o presencia de sangrados producidos por bajo recuento plaquetario, aunque los signos de sangrado suelen ser poco frecuentes.

Cabe destacar que la LLC está asociada a mayor vulnerabilidad por infecciones debidas a defectos en la inmunidad humoral y celular. Por ello, es frecuente encontrar alteraciones funcionales y de proporciones de las diferentes poblaciones de células T desde el momento del diagnóstico. Además, la mayoría de los pacientes presentan en algún momento infecciones bacterianas, que afectan fundamentalmente al tracto respiratorio y al tracto urinario. Por otro lado, es una enfermedad que se asocia de forma frecuente a manifestaciones autoinmunes como la anemia hemolítica autoinmune o la trombocitopenia.

4.2 Criterio diagnóstico según las guías IWCLL

Según las guías establecidas por el grupo internacional de leucemia linfática crónica (IWCLL, por sus siglas en inglés), el diagnóstico requiere la confirmación de la presencia de ≥ 5000 linfocitos B/ μL en la sangre periférica durante al menos 3 meses, con un inmunofenotipo característico que demuestre la clonalidad (expresión de la cadena ligera de la Ig restringida a κ o λ), la expresión positiva para CD5, CD19, CD20 y CD23 y la

ausencia o baja expresión de Igs de superficie, CD20 y CD79b (31, 43). En ocasiones la presencia de estas células tumorales se detectan en ganglios de forma predominante y no existe expresión hemoperiférica. Según la clasificación de la OMS (1), esta manifestación es considerada como LLC pero se denomina linfoma linfocítico de células pequeñas.

Como pruebas complementarias al diagnóstico se pueden realizar extensiones de sangre periférica para confirmar la presencia de linfocitos con aspecto típico de LLC y prolinfocitos en proporciones menores del 55% del total de población linfocitaria. Un porcentaje mayor de 55% hablaría a favor del diagnóstico de una leucemia prolinfocítica (LPL).

La biopsia de médula ósea puede ser útil en determinados casos, para clarificar el origen de citopenias, anemia y/o trombocitopenia (ie, autoinmune), sin embargo, esta prueba no se requiere por lo general para realizar el diagnóstico de LLC.

4.3 Diagnóstico diferencial

La presencia de una población B monoclonal con recuentos inferiores a 5×10^9 linfocitos B/L en sangre periférica, en ausencia de linfadenopatías u organomegalias y citopenias conllevará el diagnóstico de Linfocitosis B Monoclonal (LBM).

Cabe destacar que en ocasiones, las células de LLC presentan una morfología atípica con presencia de células con núcleo partido u otras características linfoplasmacitoides, y un inmunofenotipo atípico (i.e CD5⁻, CD23⁻, FMC7⁺, CD79b⁺ o alta expresión de la SmIg), lo cual puede conducir erróneamente hacia un diagnóstico de no LLC.

Asimismo, es fundamental diferenciar la LLC de otras enfermedades linfoproliferativas con expresión hemoperiférica que pueden enmascarse como LLC; por

ejemplo la leucemia de células peludas, manifestaciones leucémicas del LCM, LZM, LEZM con linfocitos vellosos o LF.

Para realizar el diagnóstico de la LLC, en el año 94 se diseñó un sistema de puntuación que permitió mejorar la técnica para establecer el diagnóstico diferencial de la LLC y otros SLPC-B. Este sistema, conocido como “Score de Matutes”, incluía la expresión de marcadores típicos de LLC determinados por citometría de flujo y establecía una clasificación en base a la presencia o ausencia de CD5, CD23, CD22, CD20, FMC7 y SmIg (44). Más tarde, este sistema sería modificado para sustituir la expresión de CD22 por CD79b (45). Aquellos casos con puntuación igual o mayor a 4 eran clasificados como LLC mientras que puntuaciones más bajas se clasificaban como no LLC.

Sin embargo, en casos con un inmunofenotipo atípico, el estudio de alteraciones citogenéticas y/o moleculares puede ser útil para realizar el diagnóstico diferencial de LLC con otros SLPC-B (Tabla I) (2). Aunque, como se ha comentado, no existe una alteración genética característica de la LLC, existen otras alteraciones cromosómicas específicas de diagnósticos no LLC tales como la traslocación t(11;14)(q13;q32) que está asociada al LCM o la traslocación t(14;18)(q32;q21) que se asocia al LF. Aquellos casos en los que no se establezca un diagnóstico diferencial alternativo, se considerará el diagnóstico de LLC atípica.

En casos más complejos, se puede recurrir a estudios de biopsia de ganglio linfático, bazo y biopsia o aspirado de médula ósea para establecer un diagnóstico de certeza.

Tabla I. Características inmunofenotípicas y moleculares de las diferentes entidades de síndromes linfoproliferativos crónicos de células B.

Patología	SmIg	CD20	CD5	CD10	CD23	CD11c	CD25	CD103	Otros
LLC	-/+	-/+	+	-	+	-/+	-	-	CD19⁺, FMC7⁺, CD200⁺
LPL	+	+	-/+	-/+	-/+	-	+	-	TP53mut
LCP	+	+	-	-	-	+	+	+	Annex A1⁺, DBA44 (++)⁺, BRAF V600Emut
LLP	+	+	-	-	-	-	-/+	-	Trisomía 4, MYD88mut
LEZM	+	+	-/+	-	+/-	-/+	-/+	-	BCL2⁺, de(17q32)
LCM	+	+	+	-	-	-	-/+	-	t(11;14)(q13;q32); cyclina D1⁺, SOX11⁺, CD200⁻
LF	+	+	-	-/+	-	-	+	-	t(14;18)(q32;q21); BCL-2⁺, CD43⁻

LLC; leucemia linfática crónica, LPL; leucemia prolinfocítica, LCP; leucemia de células peludas, LLP; linfoma linfoplasmocítico, LEZM; linfoma esplénico de la zona marginal, LCM; linfoma de células del manto, LF; linfoma folicular.

4.3.1 Biopsia de ganglio linfático

Los ganglios linfáticos en la LLC se caracterizan por una arquitectura difusa con presencia de linfocitos pequeños y con centros de proliferación dispersos conocidos como pseudofolículos o centros de proliferación. La actividad mitótica es generalmente escasa y la célula predominante en estas áreas es el linfocito característico de LLC (Figura 7). En algunos casos, las células linfoides pueden mostrar irregularidad nuclear, lo cual conduce a un diagnóstico diferencial con LCM.

Los centros de proliferación están compuestos de pequeños linfocitos, prolinfocitos y paraimunoblastos; con un núcleo ovalado, cromatina dispersada, nucléolo central eosinofílico y citoplasma ligeramente basófilo.

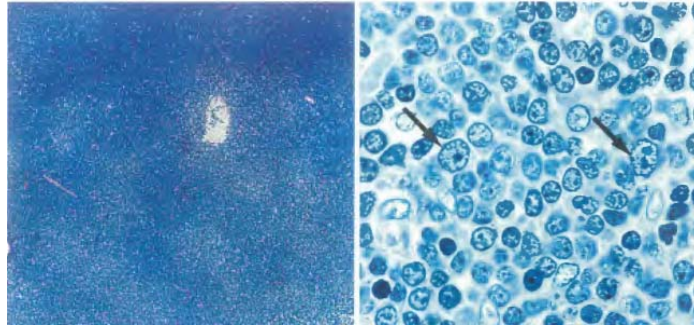


Figura 7. Histología de un ganglio linfático de LLC por tinción de Giemsa. A la izquierda se observa en azul oscuro espacios regulares correspondientes a los centros germinales. A la derecha se observa una sección a mayor aumento con linfocitos pequeños de escaso citoplasma y cromatina condensada, prolinfocitos con un tamaño ligeramente más grande, cromatina dispersa y nucléolo pequeño y paraimunoblastos (flechas), que corresponden a las células más grandes, con núcleo ovalado, cromatina dispersada y nucléolo central (1).

4.3.2 *Biopsia de bazo*

El bazo se caracteriza por la presencia de pulpa blanca generalmente prominente y extensión de la afectación hacia la pulpa roja. Los centros de proliferación se muestran menos sobresalientes en comparación con los ganglios linfáticos.

4.3.3 *Biopsia/aspirado de médula ósea*

En la preparación a partir de biopsia de médula ósea se pueden observar centros de proliferación, menos prominentes que en ganglios linfáticos, y presencia de células dendríticas. En la mayoría de los casos la proporción de células de LLC en el aspirado supera el 30% de las células totales. Además, el estudio de médula ósea aportará información sobre el grado de afectación de la enfermedad, pudiendo afectar únicamente a la zona intersticial, a la zona medular, a ambas zonas o haber una afectación difusa. Esta última afectación es considerada como signo de enfermedad avanzada.

4.4 Factores pronósticos

Los primeros sistemas de clasificación de los pacientes de LLC se desarrollaron en la década de los 70s. Estos sistemas, conocidos como sistema de estadiaje de Rai (Tabla II)

(46) y Binet (Tabla III) (47), son simples y únicamente requieren realizar un examen físico y estudios de laboratorio rutinarios. Ambas clasificaciones permiten diferenciar 3 grupos de pacientes con distinto pronóstico.

Tabla II. Clasificación de la LLC por el sistema de Rai

Estadio	Características presentes en el paciente	Riesgo
Rai 0	Presencia de linfocitosis en sangre periférica y/o médula ósea en proporciones >30%.	Bajo
Rai I-II	Presencia de linfocitosis, nódulos linfáticos aumentados en cualquier zona del cuerpo, esplenomegalia y/o hepato-esplenomegalia.	Intermedio
Rai III -IV	Presencia de anemia (Hb < 11 g/dl) o trombocitopenia (Plt < 100.000/mm ³).	Alto
Hb; Hemoglobina, Plt: plaquetas		

Tabla III. Clasificación de la LLC por el sistema de Binet.

Estadio	Características presentes en el paciente	Riesgo
Binet A	Sin evidencias de anemia (Hb ≥ 10g/dl) o trombocitopenia (Plt ≥ 100x10 ⁹ /L) y hasta dos zonas afectadas.	Bajo
Binet B	Sin evidencias de anemia (Hb ≥ 10g/dl) o trombocitopenia (Plt ≥ 100x10 ⁹ /L) y 3 o más áreas nodales u órganos con tamaño aumentado.	Intermedio
Binet C	Presencia de anemia (Hb < 10g/dl) y/o trombocitopenia (Plt < 100x10 ⁹ /L) independientemente del número de zonas linfoides afectadas.	Alto
Hb; Hemoglobina, Plt: plaquetas		

Ambos sistemas han sido (y continúan siendo en la actualidad) muy utilizados por su simplicidad y relevancia pronóstica, sin embargo, la extrema heterogeneidad del curso clínico de la LLC y los avances en el tratamiento de la enfermedad, han convertido estos dos sistemas clínicos en insuficientes para predecir el curso clínico de la LLC, sobretodo en estadios tempranos de la enfermedad.

Entre 1975 y 1995, comenzaron a describirse nuevos parámetros pronósticos correlacionados con la evolución del paciente tales como; el tiempo de duplicación linfocitaria, el patrón de afectación de médula ósea (difusa o no difusa) y el recuento absoluto de linfocitos. Posteriormente, con la evolución e implantación en la rutina clínica de nuevas técnicas de laboratorio tales como; ensayos inmuno-enzimáticos, citometría de flujo multiparamétrica, citogenética o técnicas de biología molecular, permitieron identificar nuevos marcadores pronósticos más robustos que permitían predecir la evolución de la enfermedad. Algunos de los nuevos factores pronósticos biológicos más relevantes son:

1) Marcadores de suero

Los parámetros serológicos como la Beta-2-microglobulina ($\beta 2M$, un componente del complejo HLA de clase I de células nucleadas) o la timidina kinasa (TK, una proteína intracelular involucrada en la síntesis de DNA) se han correlacionado con la carga tumoral de la enfermedad y la evolución clínica de los pacientes de LLC.

Estos marcadores serológicos han demostrado ser parámetros pronósticos robustos y tener un valor pronóstico independiente. Los pacientes con niveles de $\beta 2M \geq 3.5$ mg/L tienen menor tiempo hasta la progresión comparados con aquellos pacientes con recuentos < 3.5 mg/L; además, niveles altos de $\beta 2M$ se asocian con tasas de respuestas completas más bajas y supervivencia libre de tratamiento (SLT) más cortas tras el tratamiento con quimioterapia. De forma similar, los pacientes con valores de TK en suero < 8.5 U/L se han asociado con tiempos de duplicación linfocitaria inferior a 6 meses, menor tiempo hasta la progresión y menor tasa de respuesta a terapias tales como los análogos de las purinas (48).

2) Estado mutacional del gen de la cadena pesada de la Ig

El análisis de los reordenamientos del gen IGHV es uno de los factores pronósticos más consolidados en la LLC. Alrededor de un 50% de casos de LLC muestran genes IGHV no mutados y casi idénticos a la secuencia germinal mientras que el otro 50% de los casos muestran mutaciones somáticas. La primera vez que se describió el valor pronóstico del estado mutacional fue en 1999, al observarse que los pacientes con alto grado de mutaciones somáticas en el gen IGHV dentro del clon de LLC tenían una SG más prolongada en comparación con los pacientes con LLC con los genes IGHV no mutados (>20 años vs. 8 años) (49, 50). La Figura 8 representa un ejemplo de la mediana de supervivencia de la cohorte de la Clínica Mayo (Rochester, EEUU) según el estado mutacional del gen IGHV donde se ve mayor supervivencia en los pacientes con IGHV mutado (48).

No obstante, a pesar de ser un marcador pronóstico muy robusto, el análisis del estado mutacional de las Ig conlleva un alto coste y no está disponible en todos los laboratorios de rutina clínica.

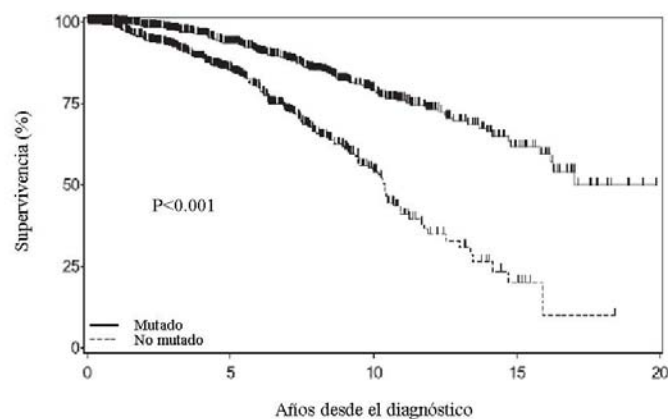


Figura 8. Supervivencia global de la cohorte de pacientes Mayo Clinic con LLC no tratada según el estado mutacional del gen IGHV desde 1995 hasta 2016 (n=1519) (48).

3) Marcadores por citometría de flujo

La búsqueda de marcadores alternativos al estado mutacional de las IGHV, dio lugar a la aparición de nuevos marcadores como CD38 y la proteína ZAP70, estudiados mediante citometría de flujo. Estos estudios, si bien no tienen el mismo impacto que el estado mutacional, resultan más económicos y requieren menor tiempo de análisis.

La positividad de ambos marcadores (definida como $\geq 30\%$ de células que expresen CD38 y $\geq 20\%$ de células que expresen ZAP70) se han correlacionado con resistencia a la terapia, menor tiempo de SLT y SG (Figura 9) (48).

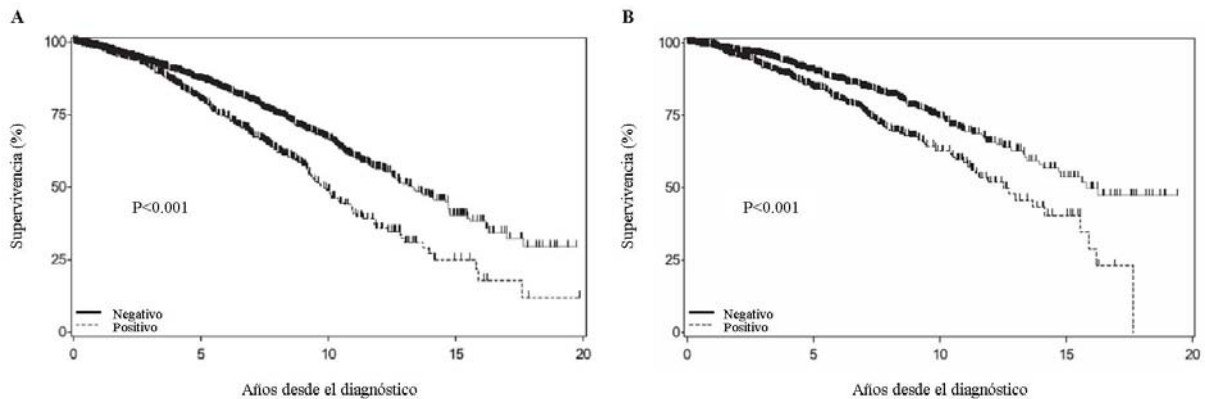


Figura 9. Supervivencia global de la cohorte de pacientes Mayo Clinic con LLC no tratada según la expresión de A) CD38 (positivo $\geq 30\%$, n=2371) y B) ZAP-70 (positivo $\geq 20\%$, n=1816) desde 1995 hasta 2016 (48).

Recientemente, se ha descrito CD49d (una de las subunidades de la integrina α -4), una molécula que tiene un papel fundamental en las interacciones entre la célula leucémica y el microambiente; como un factor pronóstico que permite predecir la evolución clínica de los pacientes de LLC (51-53). Es uno de los marcadores más utilizados en citometría de flujo como predictor del tiempo hasta el primer tratamiento y la SG, y tiene valor pronóstico de forma independiente al estado mutacional de las IGHV o las alteraciones genéticas detectadas por FISH.

La Figura 10 representa un ejemplo de la mediana de supervivencia de la cohorte de la Clínica Mayo (Rochester, EEUU) según la expresión de CD49d donde se ve mayor supervivencia en los pacientes cuyas células leucémicas presentan una menor expresión del marcador (48).

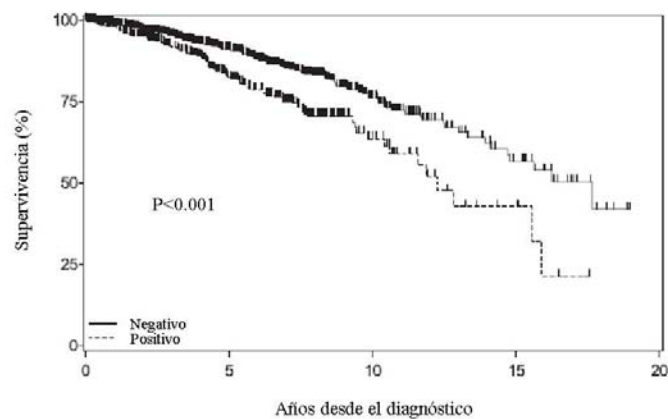


Figura 10. Supervivencia global de la cohorte de pacientes Mayo Clinic pacientes con LLC no tratada según la expresión de CD49d (positivo $\geq 30\%$, n=1476) desde 1995 hasta 2016 (48).

4) FISH y citogenética convencional

Las primeras técnicas de bandeado G convencionales pusieron de manifiesto la asociación entre la presencia de alteraciones genéticas en los cromosomas 12, 13 y 14 y el pronóstico de la LLC. Más allá, la implementación del FISH en la LLC permitió establecer un modelo jerárquico en función de las alteraciones genéticas presentes con valor pronóstico independiente (42). Según esta clasificación; los pacientes con del(17p13) tenían menor supervivencia (32 meses) y era el grupo de mayor riesgo, seguido del grupo de pacientes con del(11q23) (79 meses) como grupo de mal pronóstico, trisomía 12 (111 meses) como grupo de riesgo intermedio y por último, cariotipo normal (114 meses) y del(13q14) aislada (133 meses) como grupos de buen pronóstico (48). La Figura 11 representa la mediana de supervivencia de la cohorte de la Clínica Mayo (Rochester, EEUU) según lo anteriormente descrito (48).

Por otro lado, las mutaciones asociadas a estas alteraciones moleculares también han sido descritas como marcadores pronósticos asociados a menor tiempo de supervivencia libre de progresión (SLP) y SG (para el caso de mutaciones de *NOTCH1* o *SF3B1*) o muy mal pronóstico y resistencia al tratamiento (para mutaciones de *TP53* y *BIRC3*) (42, 48, 54).

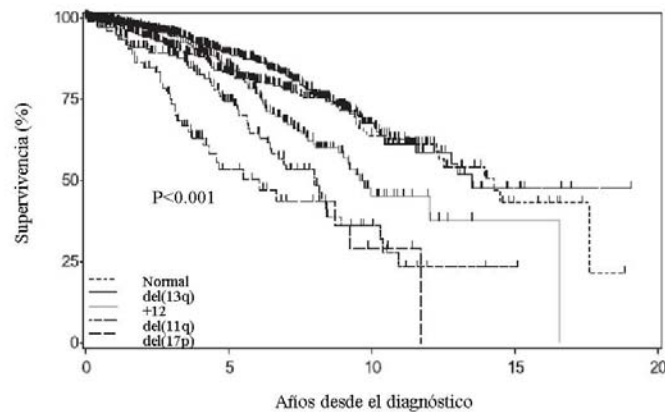


Figura 11. Supervivencia global de la cohorte de pacientes Mayo Clinic con LLC no tratada según el estudio por FISH a los 36 meses del diagnóstico (n=1639) desde 1995 hasta 2016 (48).

Además se sabe que aquellos pacientes que presentan múltiples alteraciones citogenéticas, es decir, un cariotipo complejo, se asocian a un pronóstico adverso (55, 56). A destacar, que actualmente está en discusión la definición de cariotipo complejo en la LLC ya que se ha visto que los pacientes con 5 anomalías tienen un pronóstico mucho más adverso que aquellos con 3 ó 4 alteraciones.

6) Modelos pronósticos

Más recientemente, distintos grupos han desarrollado diferentes modelos pronósticos que combinan varios marcadores clínicos y biológicos incluyendo alteraciones moleculares, tales como TP53, y que permiten predecir SG de forma más precisa (57-59).

Sin embargo estos sistemas tienen varias limitaciones, principalmente el no incluir pacientes tratados con los nuevos agentes terapéuticos o por ejemplo no considerar la presencia de comorbilidades.

5. Tratamiento de la Leucemia Linfática Crónica

Los pacientes con LLC únicamente deben ser tratados si la enfermedad depara síntomas o signos de actividad (ver sección “Diagnóstico y manejo clínico”) (31).

Para valorar el tipo de tratamiento más adecuado es necesario considerar, edad, estado funcional del paciente y comorbilidades así como alteraciones citogenéticas, principalmente alteraciones del gen *TP53* (ya sea por delección y/o mutación), y el estado mutacional de los genes IGHV. Además en pacientes en recaída es importante considerar líneas de tratamiento previas y respuesta a las mismas (43, 60).

El tratamiento con quimioinmunoterapia ha sido el tratamiento de referencia durante varias décadas. En este sentido, la combinación de anticuerpos anti-CD20 monoclonales en combinación con quimioterapia supuso un importante avance en el tratamiento de la LLC a final de la década de los 90. En pacientes jóvenes con edad inferior a 65 años, sin comorbilidades y con una función renal preservada, el tratamiento estándar era la combinación de fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR), y en pacientes mayores de 65 años se consideraba la combinación de clorambucilo con rituximab, ofatumumab o obinutuzumab, o bien la combinación de bendamustina y rituximab.

A partir del año 2013, la introducción de tratamientos biológicos dirigidos a dianas específicas, como son los inhibidores de la señalización del BCR (i.e, ibrutinib, idelalisib) o bien inhibidores de la proteína antiapoptótica BCL-2 (i.e, venetoclax) han supuesto una auténtica revolución; y recientemente distintos estudios randomizados prospectivos que han comparado el tratamiento con quimioinmunoterapia frente al tratamiento con ibrutinib

ya sea en monoterapia o en combinación con rituximab en pacientes jóvenes y mayores de 65 años, han supuesto un cambio en el tratamiento de esta enfermedad desplazando la quimioinmunoterapia a un segundo plano, e indicándose ibrutinib en primera línea prácticamente en todos los pacientes con LLC que tienen criterios de tratamiento (43, 61-65).

Por otro lado, venetoclax, un inhibidor de la proteína antiapoptótica BCL-2, ya ha sido aprobado en combinación con rituximab en pacientes en recaída, demostrando mayor eficacia frente a la quimioinmunoterapia (66), y recientemente se ha aprobado en primera línea venetoclax en combinación con obinutuzumab en pacientes mayores y con comorbilidades (67).

5.1 Evaluación de la respuesta al tratamiento

Las guías internacionales de LLC dan una descripción detallada de la evaluación de respuesta al tratamiento, pudiendo clasificarse en cuatro categorías; respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable o progresión de la enfermedad (Tabla IV) (31, 68).

Aunque la incorporación de nuevas opciones terapéuticas ha contribuido a mejorar la supervivencia de los enfermos con LLC, un gran porcentaje de pacientes que alcanzan respuestas al tratamiento acaban por recaer. Ello es debido en parte a la persistencia de células leucémicas con recuentos que pueden variar entre 10^0 y 10^{10} (69). Esta población de células resistentes al tratamiento es lo que se conoce como Enfermedad Mínima Residual (EMR).

La detección de EMR en la LLC se puede realizar mediante técnicas de citometría de flujo multiparamétrica, técnicas moleculares (incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y PCR cuantitativa (qPCR)) o la secuenciación de alta sensibilidad del gen IGHV. No obstante, en el momento actual la citometría de flujo

es considerada como la técnica de elección (70-72). Es importante señalar que, aquellos pacientes en los que no se consigue erradicar la EMR tienen peor pronóstico que aquellos en los que sí se elimina la EMR (73-75).

Tabla IV. Criterios para la definición de respuesta después del tratamiento

Parámetro clínico	Respuesta completa	Respuesta parcial	Enfermedad estable	Progresión de la enfermedad
Ganglios linfáticos	<1.5cm	Reducción del tamaño $\geq 50\%^*$	Cambio de -49% a +49%	Incremento $\geq 50\%^{\&}$
Tamaño de hígado y bazo	Bazo <13cm; hígado normal	Reducción del tamaño $\geq 50\%^*$	Cambio de -49% a +49%	Incremento $\geq 50\%^{\&}$
Síntomas B	No	Alguno	Alguno	Alguno
Recuentos de linfocitos circulantes	Normal	Reducción del tamaño $\geq 50\%^*$	Cambio de -49% a +49%	Incremento $\geq 50\%^*$
Recuento plaquetario	$\geq 100 \times 10^9/L$	$\geq 100 \times 10^9/L$ ó $\geq 50\%^*$	Cambio de -49% a +49%	Disminución $\geq 50\%^*$
Hemoglobina	$\geq 11.0g/dL$ (sin transfusiones y sin eritropoyetina)	$\geq 11.0g/dL$ ó $\geq 50\%$	Incremento <11.0g/dL ó <50%* ó disminución <2g/dL	Disminución de $\geq 2g/dL^*$
Médula ósea	Normocelular	Presencia de células de LLC, nódulos linfoides B o no realizada	Sin cambios del patrón de infiltración	Aumento de células de LLC $\geq 50\%$ en biopsias sucesivas.

*Cambios comparados con los niveles antes del tratamiento.

&Cambios comparados con los niveles antes del tratamiento o desde la última respuesta

Es por este motivo que la evaluación de la EMR se ha consolidado como una herramienta básica no solo para evaluar la respuesta a la terapia, si no para predecir la supervivencia libre de progresión (SLP) y la SG de estos pacientes. Tal es así, que en 2016 la Agencia Europea del Medicamento (EMA, por sus siglas en inglés) ha aprobado el uso de EMR no detectable en los pacientes de LLC, como un punto intermedio para los ensayos clínicos de la fase III (76).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

A lo largo de los últimos cuatro años, la doctoranda ha tenido oportunidad de trabajar en el laboratorio de Hematología Oncológica y Trasplantes anexo en el Servicio de Hematología del Hospital Santa Creu i Sant Pau de Barcelona; centro de referencia de la LLC a nivel nacional e internacional

Las hipótesis de trabajo fueron las siguientes:

- 1) El análisis de la expresión de CD200 en la LLC podría contribuir a realizar de forma más precisa el diagnóstico diferencial de LLC con otros SLPC-B y de forma relevante en aquellos casos con LLC que presentan un inmunofenotipo atípico.
- 2) El análisis de la expresión de Fc γ RIIb en la LLC podría proveer información, no solo desde el punto de vista mecanístico que regula la activación de la célula leucémica, sino también como factor pronóstico que permita predecir la evolución clínica de los pacientes.

De acuerdo a las hipótesis planteadas, y dentro de la investigación desarrollada en el laboratorio de Hematología del IIB Sant Pau, se propusieron los objetivos detallados en el siguiente apartado.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Analizar el valor diagnóstico y pronóstico de CD200 y FcγRIIb, moléculas implicadas en la regulación de la célula B en condiciones fisiológicas, en pacientes con LLC.

Objetivos secundarios

- 1) Analizar la expresión del marcador CD200 en células B, en todos los casos diagnosticados con SLPC-B en el servicio de Hematología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau que presentan linfocitosis o población de células B monoclonales en el momento del diagnóstico.
- 2) Analizar la expresión de CD200 como posible marcador para el diagnóstico diferencial de la LLC y estudiar si la adición de CD200 al sistema de puntuación propuesto por Matutes puede añadir poder discriminante en el diagnóstico de la LLC.
- 3) Comparar la expresión basal de la expresión de FcγRIIb en las células de LLC y las células B normales por citometría de flujo, utilizando un anticuerpo monoclonal específico para la isoforma FcγRIIb.
- 4) Investigar si la expresión del receptor FcγRIIb tiene valor pronóstico en pacientes de LLC y explorar la relación entre los niveles de expresión de FcγRIIb y los marcadores pronósticos más empleados para la evaluación de esta enfermedad.

ARTÍCULOS

Artículo 1. CD200 is a useful marker in the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia.

Alba Mora, Rosa Bosch, Carolina Cuellar, Eva Puy Vicente, Laura Blanco, Rodrigo Martino, José M. Ubeda, Jorge Sierra, Carol Moreno and Josep Nomdedeu.

Cytometry Part B Clin Cytom. 2018 Oct 16. doi: 10.1002/cyto.b.21722.

doi: 10.1002/cyto.b.21722. Epub 2018 Oct 16.

doi: 10.1002/cyto.b.21722. Epub 2018 Oct 16.

doi: 10.1002/cyto.b.21722. Epub 2018 Oct 16.

doi: 10.1002/cyto.b.21722. Epub 2018 Oct 16.

doi: 10.1002/cyto.b.21722. Epub 2018 Oct 16.

doi: 10.1002/cyto.b.21722. Epub 2018 Oct 16.

Artículo 2. FcγRIIb expression in early stage chronic lymphocytic leukemia.

Rosa Bosch, Alba Mora, Eva Puy Vicente, Gerardo Ferrer, Sonia Jansà, Rajendra Damle, Sergey Gorlatov, Kanti Rai, Emili Montserrat, Josep Nomdedeu, Marta Pratcorona, Laura Blanco, Silvana Saavedra, Ana Garrido, Albert Esquirol, Irene García, Miquel Granell, Rodrigo Martino, Julio Delgado, Jorge Sierra, Nicholas Chiorazzi and Carol Moreno.

Leuk Lymphoma. 2017 Nov;58 (11):2642-2648.

doi: 10.1080/10428194.2017.1307981. Epub 2017 Apr 4.

doi: 10.1080/10428194.2017.1307981. Epub 2017 Apr 4.

doi: 10.1080/10428194.2017.1307981. Epub 2017 Apr 4.

doi: 10.1080/10428194.2017.1307981. Epub 2017 Apr 4.

doi: 10.1080/10428194.2017.1307981. Epub 2017 Apr 4.

doi: 10.1080/10428194.2017.1307981. Epub 2017 Apr 4.

doi: 10.1080/10428194.2017.1307981. Epub 2017 Apr 4.

doi: 10.1080/10428194.2017.1307981. Epub 2017 Apr 4.

RESULTADOS GLOBALES

En este capítulo se desglosarán los resultados obtenidos en los trabajos previamente presentados, de acuerdo a los objetivos planteados en la tesis.

La OMS establece que para el diagnóstico de la LLC es estrictamente necesario el análisis inmunofenotípico de la célula leucémica, incluyendo CD19, CD5, CD79b, CD22, etc., cuyo patrón de expresión es característico de la mayoría de casos con esta enfermedad. Sin embargo, en los últimos años se han identificado nuevos marcadores que podrían contribuir a mejorar su diagnóstico, y entre ellos podemos encontrar la molécula CD200 que se expresa en células B normales.

El primer objetivo planteado en esta tesis fue analizar la expresión del marcador CD200 en células B de todos los casos diagnosticados con SLPC-B en el servicio de Hematología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau que presentaban linfocitosis o población de células B monoclonales en el momento del diagnóstico. Para ello, se evaluó la expresión de CD200 en células B por citometría de flujo multiparamétrica en una serie compuesta de 81 pacientes diagnosticados dentro del espectro de LLC (incluyendo LBM y linfoma linfocítico) y 39 pacientes diagnosticados con otro tipo de SLPC-B.

La expresión de CD200 fue positiva en el 100% de los casos de LLC (definida como $>30\%$ de células B que expresan el marcador con $MFI \geq 10^1$). Sin embargo, se encontró una expresión bastante variable dentro del grupo de no LLC, con expresión positiva de CD200 en 1 de 5 casos de LCM, 13 de 19 casos de LZM y 2 de 2 casos de LF.

Por otra parte, la expresión de CD200 también fue analizada por MFI en células B $CD19^+$ o $CD22^+$ y se observó un comportamiento más heterogéneo, habiendo expresión alta ($MFI \geq 10^3$) en las células de LLC (independientemente de su clasificación en típica o atípica), moderada ($MFI 10^2-10^3$) en células de LF o LZM y baja o negativa ($MFI \leq 10^2$) en LCM.

En segundo lugar nos planteamos analizar la expresión de CD200 como posible marcador para el diagnóstico diferencial de la LLC y estudiar si su adición al sistema de puntuación propuesto por Matutes podía tener un papel importante para discriminar el diagnóstico de la LLC.

Tras comprobar que la expresión de CD200 era significativamente mayor en células de LLC, se analizó la expresión de CD200 de forma individual como herramienta para establecer el diagnóstico diferencial de esta enfermedad con otros SLPC-B.

La precisión de la molécula CD200 para establecer el diagnóstico de LLC resultó similar a la obtenida con los marcadores típicamente empleados en el Score de Matute (rango: 79.2-86.7%), a excepción de la SmIg cuya precisión resultó significativamente menor (59.1%). No obstante, CD200 demostró ser un marcador con alta sensibilidad (100%) y baja especificidad (35.9%) a la hora de establecer el diagnóstico diferencial por sí sólo.

Con el fin de analizar si CD200 contribuía a mejorar la precisión del diagnóstico de LLC en combinación con los marcadores comúnmente utilizados, se incluyó en el sistema de puntuación de Matutes; añadiendo un punto en aquellos casos con expresión de CD200 positiva (>30%). Según este sistema, al considerar el diagnóstico de la LLC en aquellos casos con puntuación ≥ 4 , se observaba un incremento de la precisión del diagnóstico desde un 86.7% a un 92.5%, debido a la reclasificación dentro del grupo de LLC de 9 de los 16 casos clasificados previamente como LLC atípica (Ver Sección Anexos, Tabla Suplementaria 2). Este mismo análisis fue realizado con CD200 estudiado a partir de MFIR, no obstante, los resultados mostraron precisiones similares a las obtenidas por porcentaje de células con expresión positiva.

Por otra parte, uno de los principales inconvenientes durante el manejo clínico de la LLC es la heterogeneidad que caracteriza al curso de la enfermedad desde el punto de vista clínico y biológico. En este sentido, cabe destacar el papel fundamental del BCR para la supervivencia de la célula leucémica, sin embargo, no se conoce por completo el mecanismo molecular que hay detrás de este proceso.

Teniendo en cuenta que en condiciones fisiológicas la señalización a través del BCR puede ser regulada de forma negativa por el co-receptor FcγRIIb, el tercer objetivo de esta tesis fue comparar la expresión basal de FcγRIIb en células B de pacientes con LLC y células B normales de donantes sanos por citometría de flujo, utilizando para ello un anticuerpo monoclonal específico para la isoforma FcγRIIb.

Este análisis se realizó en una serie con 155 casos diagnosticados de LLC que no habían recibido terapia previamente (características clínicas y biológicas recogidas en la Sección Anexos, Tabla Suplementaria 3) y 34 donantes sanos. Los resultados obtenidos demostraron que la expresión de FcγRIIb era similar en células leucémicas CD19⁺CD5⁺ y en células B normales CD19⁺ de donantes sanos (MFIR: 47.6 vs. 49.4), sin embargo, las células leucémicas mostraron mayor heterogeneidad: observándose mayor expresión del co-receptor en células CD49d⁺ y CD38⁺ comparadas con las células CD49d⁻ y CD38⁻. Adicionalmente se evaluó FcγRIIb en células leucémicas a diferentes momentos previos al inicio de terapia, sin embargo su expresión no mostró variaciones significativas (Ver Sección Anexos, Figura Suplementaria 1).

Este trabajo abría nuevas líneas de investigación para analizar si la expresión del receptor FcγRIIb tiene valor pronóstico en pacientes de LLC y explorar la relación entre los niveles de expresión de FcγRIIb y los marcadores pronósticos más empleados para la evaluación de esta enfermedad. Es por ello que en primer lugar se evaluó la posible

correlación entre los niveles de expresión de FcγRIIb y otros marcadores pronósticos de la enfermedad (estadios clínicos, Beta-2-microglobulina (B2M) determinada en suero, estado mutacional del gen IGHV, expresión de ZAP-70 y CD38, y citogenética por FISH). No obstante, no se observó una asociación entre la expresión de FcγRIIb y otros marcadores pronósticos; a excepción de la edad y la expresión de CD49d en los que se obtuvo una pequeña concordancia.

El 21% de los pacientes incluidos en la serie, necesitaron terapia tras una mediana de seguimiento de 6.5 años, pero no hubo diferencias en cuanto a los distintos regímenes de tratamiento o respuestas y los niveles de expresión de FcγRIIb.

Por otro lado, los niveles de B2M, la expresión de ZAP-70, CD38 y CD49d, el estado mutacional del gen IGHV y la citogenética por FISH mostraron una correlación con una menor supervivencia libre de tratamiento SLT. Además se observó una tendencia de menor SLT cuando se presentaban niveles de expresión de FcγRIIb más bajos, sin embargo, no se pudo realizar el estudio multivariado debido al reducido número de pacientes.

DISCUSIÓN GLOBAL

La LLC es el tipo de leucemia más frecuente en países occidentales y se caracteriza por la acumulación de linfocitos B maduros clonales con un inmunofenotipo característico. Si bien el diagnóstico de la enfermedad es en general un proceso relativamente sencillo, en algunas ocasiones su diagnóstico puede conllevar dificultades y confundirse con otros SLPC-B con expresión hemoperiférica.

Por otro parte, la LLC es una enfermedad con un curso clínico extremadamente heterogéneo; mientras que en la mayoría de casos la enfermedad es indolente y el paciente permanece estable durante décadas, existe un porcentaje de pacientes no despreciable que presentan un curso clínico agresivo, requieren iniciar tratamiento de forma precoz y tienen una supervivencia acortada. Esta heterogeneidad clínica se ve reflejada también a nivel biológico. Así, la presencia o ausencia de mutaciones de las IGHV y alteraciones citogenéticas específicas tales como la del(17p) o del(11q) permiten distinguir pacientes con LLC con curso clínico distinto.

Teniendo en cuenta las dificultades que pueden existir para el diagnóstico de la enfermedad así como la relevancia en determinar el pronóstico del paciente en una enfermedad con curso clínico extremadamente heterogéneo, en esta tesis se planteó como objetivo fundamental, investigar la expresión en células LLC de dos biomarcadores presentes en la célula B normal, CD200 y FcγRIIb, fundamentales durante la regulación de la actividad celular en condiciones fisiológicas; y analizar así su posible papel en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

CD200 como biomarcador diagnóstico de la LLC

La supervivencia de los pacientes diagnosticados de LLC ha mejorado de forma considerable en los últimos años. Ello es debido en gran parte a los grandes avances acaecidos en el tratamiento de esta enfermedad, con la introducción de tratamientos más efectivos. Sin embargo, otro de los factores condicionantes que han permitido mejorar el pronóstico de los pacientes con LLC ha sido la evolución de los protocolos de evaluación de los SLPC-B, que han conducido a establecer diagnósticos más precisos y de forma más temprana.

Inicialmente, el diagnóstico de LLC requería la confirmación de la presencia de linfocitos B monoclonales y la caracterización inmunofenotípica a partir del estudio de SmIg, CD19, CD20 o CD24 y CD5 en sangre periférica (77). No obstante, el grupo europeo de investigación en LLC (ERIC, por sus siglas en inglés) entre otros, ha realizado grandes esfuerzos para mejorar la definición de las características biológicas de la célula leucémica, que a su vez contribuyeran a mejorar el diagnóstico utilizando la citometría de flujo (33, 78, 79); una técnica que se ha vuelto esencial para el diagnóstico de las enfermedades hematológicas.

Durante más de 30 años, estos estudios han sido ampliamente revisados por el grupo internacional de trabajo en LLC (IWCLL) para establecer las guías del manejo clínico (31, 68, 79). De este modo, la última actualización de las guías ha establecido el diagnóstico de LLC a partir del recuento de células B monoclonales en sangre periférica y la presencia de los marcadores inmunofenotípicos; SmIg^{débil}; CD5⁺, CD19⁺, CD20^{débil} y CD23 (31). Sin embargo, continúan existiendo casos de LLC en los que el inmunofenotipo se manifiesta de forma atípica, lo cual dificulta el diagnóstico. Por este motivo, la última clasificación de las neoplasias hematológicas elaborada por la OMS ha introducido marcadores que pueden

ser de utilidad durante el manejo diario (1). Entre estos marcadores encontramos la molécula CD200, una glucoproteína expresada en poblaciones de células B entre otras, cuya interacción con el receptor CD200R1 y CD200R2 en humanos promueve la regulación de los procesos inflamatorios llevados a cabo durante la respuesta innata mientras se desarrolla la inmunidad adquirida (80).

En el presente trabajo se analizó la expresión de CD200 en una cohorte de 120 pacientes diagnosticados con SLPC-B y su implicación clínica en el diagnóstico de la LLC. Los resultados demostraron que las células B de LLC expresan niveles altos de CD200 prácticamente en la totalidad de la población; con independencia de la co-expresión de otros marcadores. Estos resultados mostraron concordancia con lo descrito previamente, donde se postulaba el marcador CD200 como característico de la LLC (81-84). Sin embargo, el resto de SLPC-B mostraron menores niveles de expresión y porcentajes de células con expresión de CD200 más heterogéneos.

En los últimos años se ha remarcado la importancia del marcador CD200 para distinguir los casos de LZM y LCP, LCM y LLC o LF y LLC (85). Sin embargo, nuestros resultados demostraron la existencia de casos de LCM, LZM y LF con expresión de CD200 positiva, tal y como se había reportado en otras series de pacientes (86-89). Estos datos demostraron que si bien CD200 está presente en las células de LLC, su expresión no es específica de esta enfermedad.

Para conocer el posible papel diagnóstico de CD200 se comparó la sensibilidad, especificidad y precisión con los datos de los marcadores diagnósticos más utilizados en la actualidad; CD5, CD23, FMC7, SmIg o CD79b. Como cabía de esperar por los resultados obtenidos previamente, CD200 demostró ser un marcador sensible pero poco específico para distinguir la LLC de otras enfermedades linfoproliferativas, aunque su precisión para

establecer el diagnóstico diferencial de LLC resultó similar o incluso algo superior a la obtenida con el resto de marcadores.

El algoritmo descrito por Matutes y Catovsky hace más de 20 años demostró que la combinación de diferentes marcadores característicos de la LLC ayudaban a establecer el diagnóstico diferencial de una forma más precisa que si se usaban los marcadores de manera individual (44, 45). Este sistema, que consiste en adjudicar puntuación cuando el paciente presenta unas características inmunofenotípicas determinadas ($CD5^+$, $CD23^+$, $FMC7^{débil}$, $SmIg (\kappa/\lambda)^{débil}$ y $CD79b^{débil}$), continúa siendo hoy en día utilizado por muchos hematólogos. No obstante, tal y como comentábamos previamente, existen casos de LLC que en este caso solapan en cuanto a puntuación con otras enfermedades linfoproliferativas; siendo entonces necesario complementar el estudio con otras técnicas de laboratorio que permitan descartar otro diagnóstico (i.e estudios citogenéticos y/o moleculares).

Para resolver este problema, en nuestro grupo se planteó estudiar si $CD200$ podría mejorar la precisión del sistema de Matutes. Siguiendo la metodología tradicional, se calculó la puntuación según el inmunofenotipo de los pacientes, añadiendo 1 punto en aquellos casos con más de un 30% de células positivas, y se consideró que aquellos pacientes con 4 puntos o más pertenecían al grupo diagnosticado con LLC, de acuerdo al criterio establecido por las guías internacionales.

De los 120 pacientes analizados en esta serie, la adición de $CD200$ reclasificó correctamente 7 de los 16 casos de LLC que previamente fueron categorizados dentro del grupo de no LLC. De esta manera la precisión del diagnóstico aumentó del 86.7% al 92.5%. Estos datos apoyaron los resultados publicados durante la redacción del artículo aquí presentado por el grupo de Kohnke et al. (82), confirmando que la combinación de

CD200 con otros marcadores es útil para establecer el diagnóstico diferencial de la LLC. No obstante, en este estudio se propuso el uso combinado de los 6 marcadores aplicando una fórmula a partir de la intensidad de expresión. En nuestra serie analizamos la expresión de CD200 por intensidad de fluorescencia relativa (MFIR, por sus siglas en inglés) y por porcentaje de células positivas (entendiendo positivo como más de un 30% de células B CD200⁺) (84, 87). Sin embargo, la precisión diagnóstica del marcador analizada por ambos métodos no mostró diferencias significativas. Teniendo en cuenta que el cálculo de la MFIR requiere su relativización al control negativo, y eso ralentiza la interpretación los resultados, nosotros consideramos que el análisis de CD200 como porcentaje de células positivas es una técnica más práctica para ser implementado en el laboratorio.

Sorprendentemente, la eliminación del marcador SmIg no modificó esa precisión, posiblemente porque la Ig de membrana tiene expresión muy variable dentro de los síndromes linfoproliferativos (90).

En definitiva, nuestros resultados demostraron que si bien CD200 es una molécula presente en las células de LLC, su expresión no es exclusiva de la enfermedad y no debe ser considerado como única referencia para distinguir la LLC del resto de SLPC-B. No obstante, su uso combinado puede ayudar a clasificar los casos de LLC con diagnóstico incierto, distinguiéndolos fundamentalmente de pacientes con diagnóstico de LCM, tal y como han propuesto el grupo ERIC y la Sociedad Europea de análisis clínico celular (ESCCA, por sus siglas en inglés).

FcγRIIb como biomarcador pronóstico de la LLC

La primera aproximación pronóstica en la LLC, se realizó a partir de la elaboración de los sistemas de clasificación según los diferentes estadios de Rai y Binet en la década de los 70 y 80 (46, 47). Ambos sistemas continúan siendo de gran utilidad para la práctica clínica; sin embargo, los avances relativos a terapia y a las características biológicas de la célula de la LLC, han puesto de manifiesto la existencia de nuevos subgrupos de pacientes, haciendo necesario actualizar y desarrollar nuevas aproximaciones pronósticas y predictivas. De este modo, la profundización de la investigación en este campo llevó a la definición de biomarcadores pronósticos como; marcadores serológicos (niveles de $\beta 2M$ o TK), marcadores inmunofenotípicos (expresión de ZAP-70, CD38 o CD49d) o marcadores genéticos detectados por FISH, secuenciación de sanger o secuenciación masiva (estado mutacional del IGHV, alteraciones cromosómicas, mutaciones puntuales, etc.).

Siguiendo la línea de investigación desarrollada en el laboratorio, focalizada en la caracterización del receptor FcγRIIb (también conocido como CD32) en células de LLC, se elaboró un análisis sobre la expresión de FcγRIIb en LLC y su posible papel pronóstico.

El receptor FcγRIIb pertenece a la familia de receptores Fcγ y es la principal isoforma expresada en células B conjuntamente con FcγRIIa. Además, se caracteriza por poseer baja afinidad por las Ig de tipo G y, al contrario que FcγRIIa, funciona como un receptor inhibidor del BCR en condiciones fisiológicas. Aunque su expresión en células B de LLC fue descrita por primera vez en 1991 por Legac E. et al (91), su papel regulador sobre el BCR de células de leucémicas continúa siendo desconocido. Nuestro estudio comenzó por analizar la expresión génica de este receptor en células B CD19⁺CD5⁺ de pacientes de LLC.

En nuestra serie, 86 de 155 pacientes de LLC con estadios tempranos de la enfermedad mostraron expresión positiva de FcγRIIb, con mediana de expresión similar a la observada en células B normales. Aunque estos resultados mostraron concordancia con trabajos anteriores (34, 92, 93), nuestro estudio permitió realizar una mejor aproximación en cuanto a la expresión del receptor en LLC, al incluir por primera vez el uso de un anticuerpo específicamente diseñado para reconocer la isoforma de FcγRIIb; evitando así señal inespecífica por unión a FcγRIIa.

Un dato a destacar fue el rango de dispersión de la mediana de intensidad de fluorescencia; que mostró ser mayor en las células de LLC que en células B normales, con expresión considerablemente más alta en un 6.5% de pacientes de LLC de la serie. Para conocer si esa dispersión podía derivar de la coexistencia de diferentes clonas leucémicas, se analizó la expresión de FcγRIIb según la expresión de CD49d y CD38, mediadores de la migración y activación de la célula B respectivamente. Los resultados mostraron mayor expresión de FcγRIIb en células CD38⁺ y CD49d⁺, ambas relacionadas con mal pronóstico. Esa relación entre la mayor expresión de FcγRIIb y marcadores de evolución adversa de la enfermedad, nos planteó la posibilidad de que FcγRIIb esté actuando como inhibidor del BCR en células leucémicas y lo que es más importante para nuestro estudio, sentó las bases sobre su posible papel pronóstico en LLC.

A diferencia de lo que sucede en los estudios de ZAP-70, CD38 o CD49d donde se observan diferencias en cuanto al porcentaje de células que expresan el marcador (49, 53, 94-97), nuestro análisis de FcγRIIb mostró expresión en la totalidad de las células de LLC. Una de las principales limitaciones para el estudio de biomarcadores es el análisis de los mismos como variables continuas. No obstante, la heterogeneidad presente en la intensidad de expresión, nos permitió establecer el valor de MFIR \geq 45.4 como punto de corte de positividad para el marcador y convertir la expresión del receptor en una variable

dicotómica; para correlacionarlo con la expresión con otros marcadores y analizar diferencias en cuanto a SLT.

Posteriormente se analizó la correlación entre la expresión de FcγRIIb y los marcadores pronósticos de LLC más utilizados y analizados en nuestra institución. En nuestra serie se observó una leve correlación entre FcγRIIb y CD49d. Sin embargo, el estudio de correlación con otros marcadores pronósticos tales como edad, género, recuento celular, niveles de Hb, LDH o B2M, estado mutacional del gen IGHV, alteraciones citogenéticas o expresión de proteínas como CD38 o ZAP-70, no mostraron resultados significativos.

Aunque previamente el grupo de Lim SH et al. describieron una asociación negativa entre el estado mutacional de IGHV, la expresión de CD38 o de ZAP-70 y la internalización de CD20 dependiente de FcγRIIb en células de LLC (93), nuestros resultados podrían ir en la línea de lo descrito por el grupo de Vaughan A.T et al. En ese estudio, demostraron la existencia de un proceso endocítico de CD19 o CD38 mediado por FcγRIIb (98). De este modo, la correlación negativa que obtuvimos entre la expresión de co-receptores de células B como ZAP-70 y CD38 y la expresión de FcγRIIb, podría ser debida a la pérdida de ambos marcadores ante niveles altos del receptor.

Es importante tener en cuenta que un factor pronóstico puede ser a la vez un factor predictor de respuesta a un tratamiento específico que son los factores que cobran mayor relevancia cuando el paciente requiere tratamiento (99). Por este motivo, en nuestra serie analizamos si la expresión de FcγRIIb a parte de tener valor pronóstico nos permitía predecir la respuesta a tratamiento. Aunque los datos estuvieron basados en un reducido número de casos, en nuestro estudio no observamos diferencias entre los niveles de expresión de FcγRIIb determinados previos al inicio de tratamiento y respuesta al mismo.

Sin embargo, los datos obtenidos plantean nuevas líneas de investigación para conocer si aquellos pacientes con expresión positiva de FcγRIIb y CD49d se ven más beneficiados bajo tratamientos basados en combinaciones con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el epítipo de CD20.

Se ha descrito que pacientes con LCM y niveles de expresión de FcγRIIb altos tienen una SLP más corta cuando son tratados con Rituximab (93), posiblemente como consecuencia de la pérdida del epítipo CD20 por el proceso de internalización descrita por Lim SH et al (93). Sin embargo, en la LLC, el BCR juega un papel importante en cuanto a la supervivencia de la célula leucémica, y en condiciones fisiológicas, una hiperactivación de la célula B sería inhibida por el receptor FcγRIIb; lo cual justificaría los resultados que obtuvimos en cuanto a la relación entre mayor SLT y expresión de FcγRIIb.

En nuestra serie no se pudo analizar la SLT por estudio multivariado, sin embargo una publicación posterior a la aceptación de nuestro artículo, describió un caso clínico de LLC donde la coexistencia de una delección deleción en el cromosoma 1 (del(1q23.1)) y en el cromosoma 13 (del(13q14)) junto con la presencia de NOTCH1 mutado afecta a la expresión de génica de la familia de receptores Fc y conlleva un pronóstico negativo de forma independiente a otros biomarcadores pronósticos de la LLC (100). Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de ampliar el conocimiento sobre el valor pronóstico de FcγRIIb en la LLC.

En resumen, nuestro estudio demuestra que los niveles de expresión de FcγRIIb son similares entre las células B normales de donantes sanos y las células leucémicas de pacientes de LLC. Sin embargo, la expresión del marcador es variable entre las clonas de LLC y por tanto resulta más heterogénea. Además, los pacientes con niveles de expresión más altos del receptor, mostraron tendencia a mayor tiempo de supervivencia libre de

tratamiento, lo cual parece indicar que el receptor Fc γ RIIb podría tener un papel importante en la regulación negativa de la actividad de la célula leucémica.

En conclusión, en la presente tesis hemos descrito que CD200 y Fc γ RIIb son marcadores que están presentes en las células de LLC y por tanto podrían influir en el comportamiento de la célula leucémica o en la evolución clínica del paciente. Además, ambos marcadores pueden ser analizados de forma cualitativa (expresión positiva o negativa) en lugar de cuantitativamente y para su análisis se requiere únicamente la extracción de muestras de sangre periférica y emplear citometría de flujo de rutina sin necesidad de una formación específica complementaria. Aunque son necesarios nuevos estudios que amplíen el número de pacientes analizados, validen los resultados en cohortes de diferentes centros empleando la misma metodología, CD200 y Fc γ RIIb son marcadores con relevancia clínica para el diagnóstico y pronóstico de la LLC.

CONCLUSIONES

Como resultado de los trabajos aquí presentados, se concluye que:

1. CD200 es un marcador que se expresa en la práctica totalidad de las células de LLC, mientras que su expresión es heterogénea en pacientes con diagnóstico de SLPC-B no LLC.
2. A pesar de que CD200 no es un marcador específico de LLC, su combinación con otros marcadores característicos de LLC contribuye a mejorar la precisión del diagnóstico diferencial de la enfermedad con otros SLPC-B.
3. La expresión de Fc γ RIIb es similar en células leucémicas y células B normales, aunque dicha expresión es heterogénea en subclones de LLC.
4. Niveles más altos de expresión de Fc γ RIIb se asocian a una SLT más prolongada en pacientes de LLC previamente no tratados, lo cual señala su posible papel como regulador negativo de la activación del BCR en células leucémicas.

LÍNEAS DE TRABAJO FUTURO

Trabajos futuros con CD200

El sistema inmune consta de diversos mecanismos activadores e inhibidores que mantienen la homeostasis inmunológica. Entre estos mecanismos encontramos la molécula CD200, que en condiciones fisiológicas se expresa en la superficie de la membrana celular y participa en la modulación de respuesta inmune actuando como ligando del receptor CD200R presente en células T (101).

Debido al papel que desempeña CD200 en la célula B normal para controlar la tolerancia inmunológica, cabría pensar que esta molécula también esté formando parte de la comunicación entre la célula leucémica y el microambiente. Sin embargo, tal y como se ha descrito y demostrado en el presente trabajo, las células de LLC expresan la molécula CD200 con mayor intensidad que las células B de donantes sanos, lo cual podría conllevar a una situación patológica del mecanismo regulador sobre la actividad de las células T en estos pacientes. No obstante, CD200 no dispone de un dominio intracelular que active vías de señalización en la propia célula, de modo que su mecanismo de actuación únicamente se realiza a través de la interacción con su receptor.

Aunque los primeros anticuerpos dirigidos contra CD200 se diseñaron como herramienta para identificar el antígeno en células de rata, su uso se amplió posteriormente para estudiar el bloqueo de la interacción CD200-CD200R y su repercusión a nivel funcional. Así, el grupo de Kretz-Rommel et al. describieron que, el bloqueo de la interacción ligando-receptor con el anticuerpo anti-CD200 inhibía el crecimiento tumoral en un modelo murino al que se le implantaron células polimorfonucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) de donantes sanos y células tumorales transfectadas para expresar de forma estable CD200 (102).

Hoy en día no existen anticuerpos anti-CD200 aprobados para ser utilizados en humanos y por tanto, el mecanismo de actuación por el cual regularía la interacción con el receptor en LLC “*in vivo*” sigue siendo desconocido. Sin embargo, Fraietta J.A et al. describieron que en pacientes de LLC tratados con Ibrutinib se incrementa la expansión de células CD19-CAR-T (células T transducidas con un receptor quimérico antigénico modificado para reconocer células B) y además correlaciona con menor expresión de CD200 en células de LLC (103).

Ante estos resultados, y dado que son numerosos los estudios que han demostrado que el tratamiento con Ibrutinib regenera el sistema inmunológico en la LLC, con reversión del balance Th1/Th2 o la normalización de secreción de citoquinas entre otros aspectos (104, 105); este inhibidor del BCR también podría estar interviniendo en la reducción de la expresión de la molécula de CD200 y controlando el microambiente tumoral. Por este motivo, sería interesante continuar esta línea de investigación analizando las condiciones de expresión del receptor CD200R en células T a lo largo de la evolución de la LLC y conocer su comportamiento en contexto de las nuevas terapias.

En un primer lugar, y para conocer la situación global de la interacción CD200-CD200R en el contexto patológico, se estudiaría la expresión de CD200 en células B CD19⁺CD5⁺ y la expresión de CD200R en células T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ a partir de muestras de sangre periférica de pacientes de LLC con diferentes estadios clínicos de la enfermedad. De esta forma podríamos analizar la correlación entre la expresión del ligando y el receptor de acuerdo a la evolución de la LLC y además, conocer si como consecuencia de un mecanismo de regulación negativa en la célula T, aumentan los niveles de expresión del receptor cuando la enfermedad está más avanzada.

Una vez conocidos los niveles de expresión de CD200R en las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺, se seleccionarían aquellos pacientes que han recibido tratamiento con Ibrutinib, para estudiar el comportamiento de la expresión de CD200 y CD200R en el contexto de esta terapia. De obtenerse resultados que indiquen una menor expresión del receptor bajo efectos del tratamiento, se ampliaría el estudio de las poblaciones T linfocitarias para analizar la caída de expresión en estas subpoblaciones durante el proceso de reconstitución del sistema inmune.

Esta primera aproximación del mecanismo regulador de CD200-CD200R daría pie a nuevos estudios que determinen el mecanismo molecular por el cual la célula leucémica podría controlar su microambiente a través de la inhibición de la función antitumoral de la célula T en la LLC, y a diseñar nuevas dianas terapéuticas.

Trabajos futuros con FcγRIIb

Las guías establecidas por el “iwCLL” no recomiendan el uso de un único sistema pronóstico sino incorporar comorbilidades, un factor importante en el curso clínico del paciente dado la media de edad al diagnóstico. Tradicionalmente se ha utilizado el FISH y el análisis del estado mutacional del IGHV como tests estándar, siempre y cuando haya recursos suficientes. Sin embargo, a lo largo de los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para integrar todos los factores pronósticos identificados en un único sistema pronóstico.

Como continuidad de la línea de investigación en este área, y enlazando con el trabajo descrito en esta tesis, en un futuro se incluirían nuevos pacientes para ampliar la serie y realizar un estudio multivariante con el resto de marcadores pronósticos.

Por otro lado, la aparición de nuevos ensayos y opciones terapéuticas, como Ibrutinib, Idelalisib o Venetoclax, ha puesto de manifiesto la necesidad de definir parámetros clínicos que se ajusten al estado del paciente y pongan punto final a la terapia, evitando toxicidad acumulada o anticipándose a recaídas del paciente. Definir el comportamiento de FcγRIIb según la línea de tratamiento y su respuesta al mismo, ayudaría a conocer su posible papel predictivo y diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

Además, la LLC se caracteriza por una expansión clonal y acumulación de células leucémicas en órganos linfoides. Aunque los mecanismos por los cuales sucede continúan siendo desconocidos, se considera que estos sucesos podrían derivar de defectos en los procesos de apoptosis o como consecuencia de un lento pero anómalo proceso linfoproliferativo (8). Uno de los principales factores que podría estar interviniendo en la regulación de estos procesos y que podría ser vital para la supervivencia de la célula tumoral es la señalización por el BCR, caracterizado en la LLC por su mayor señalización tónica. Esta señalización puede ser regulada negativamente a través de la interacción FcγRIIb. No obstante, el mecanismo de acción de este receptor en células B normales y especialmente en células de LLC, apenas se conoce.

Teniendo en cuenta que el BCR juega un papel tan importante en la patogénesis de la LLC, la línea de investigación de FcγRIIb continuaría describiendo los niveles de expresión según los diferentes estadios de la enfermedad y realizando un análisis funcional de FcγRIIb para conocer el mecanismo por el cual puede estar regulando a la célula leucémica. Dicho análisis constaría en primer lugar de un estudio molecular para conocer las posibles moléculas involucradas en la coligación del BCR-FcγRIIb o la única homoagregación de FcγRIIb.

Para este estudio se analizaría por técnicas de hibridación proteicas todas aquellas moléculas susceptibles de interactuar en la vía del BCR como son el dominio ITIM de Fc γ RIIb, SHIP-1, LYN, SYK, ERK, AKT, BTK y NF κ B. Además, el estudio se completaría para analizar la implicación del receptor en la viabilidad, apoptosis, activación y niveles de proliferación de las células leucémicas en comparación con las células B normales.

En definitiva, el análisis de la regulación del BCR por Fc γ RIIb podría contribuir a mejorar el conocimiento de la biología de la célula leucémica y su interacción con el microambiente; y a diseñar nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso de un anticuerpo anti-Fc γ RIIb que inhiba el BCR.

BIBLIOGRAFÍA

1. Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al. (Eds): WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition). IARC: Lyon 2017.
2. Scarfo L, Ferreri AJ, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016;104:169-82.
3. Anastasiou I, Skoufias S, Katafigiotis I, Skarmoutsos I, Constantinides CA. B-lymphocytic infiltration of the prostate to a patient with chronic lymphocytic leukemia. A case report. *Archivio italiano di urologia, andrologia : organo ufficiale [di] Societa italiana di ecografia urologica e nefrologica*. 2017;89(1):83-4.
4. Da'as N, Polliack A, Cohen Y, Amir G, Darmon D, Kleinman Y, et al. Kidney involvement and renal manifestations in non-Hodgkin's lymphoma and lymphocytic leukemia: a retrospective study in 700 patients. *European journal of haematology*. 2001;67(3):158-64.
5. Robak E, Robak T. Skin lesions in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2007;48(5):855-65.
6. Strati P, Uhm JH, Kaufmann TJ, Nabhan C, Parikh SA, Hanson CA, et al. Prevalence and characteristics of central nervous system involvement by chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(4):458-65.
7. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010;116(19):3724-34.
8. Strati P, Jain N, O'Brien S. Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic proceedings*. 2018;93(5):651-64.
9. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>.
10. Shanafelt TD, Rabe KG, Kay NE, Zent CS, Jelinek DF, Reinalda MS, et al. Age at diagnosis and the utility of prognostic testing in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2010;116(20):4777-87.
11. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF. SEER Cancer Statistics Review (CSR), 1975-2011. National Cancer Institute, Bethesda, MD, based on November 2013 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2014. Available at: seer.cancer.gov/csr/1975_2011/.
12. Aljurf M, Rawas F, Alnounou R, Bakshi N, Chaudhri N, Khalil S, et al. Prevalence and relative proportions of CLL and non-CLL monoclonal B-cell lymphocytosis phenotypes in the Middle Eastern population. *Hematology/oncology and stem cell therapy*. 2017;10(1):42-3.
13. Slager SL, Benavente Y, Blair A, Vermeulen R, Cerhan JR, Costantini AS, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2014;2014(48):41-51.
14. Berndt SI, Skibola CF, Joseph V, Camp NJ, Nieters A, Wang Z, et al. Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics*. 2013;45(8):868-76.
15. Marcucci F, Mele A. Hepatitis viruses and non-Hodgkin lymphoma: epidemiology, mechanisms of tumorigenesis, and therapeutic opportunities. *Blood*. 2011;117(6):1792-8.
16. Herreros B, Sanchez-Agulere A, Piris M. Lymphoma microenvironment. In: Magrath IT, Bathia K, Boffetta P, Dearden C, Diehl V, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Potter M, Rohatiner A, eds. *The Lymphoid Neoplasms*, 3rd edn. London, UK: Oxford University Press, 2010:1552.
17. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*. 2011;117(6):1781-91.
18. Garcia-Munoz R, Llorente L. Chronic lymphocytic leukaemia: could immunological tolerance mechanisms be the origin of lymphoid neoplasms? *Immunology*. 2014;142(4):536-50.
19. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Durig J, et al. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(12):2183-98.

20. Gaidano G, Foa R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(10):3432-8.
21. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Cancer*. 2010;10(1):37-50.
22. Garcia-Munoz R, Feliu J, Llorente L. The top ten clues to understand the origin of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Journal of autoimmunity*. 2015;56:81-6.
23. Garcia-Munoz R, Galiacho VR, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Annals of hematology*. 2012;91(7):981-96.
24. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*. 2004;103(12):4389-95.
25. Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood*. 2015;126(5):573-81.
26. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(3):145-62.
27. Hadzidimitriou A, Darzentas N, Murray F, Smilevska T, Arvaniti E, Tresoldi C, et al. Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;113(2):403-11.
28. Coelho V, Krysov S, Steele A, Sanchez Hidalgo M, Johnson PW, Chana PS, et al. Identification in CLL of circulating intraclonal subgroups with varying B-cell receptor expression and function. *Blood*. 2013;122(15):2664-72.
29. Ten Hacken E, Guieze R, Wu CJ. SnapShot: Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer cell*. 2017;32(5):716-e1.
30. Quijada-Alamo M, Hernandez-Sanchez M, Robledo C, Hernandez-Sanchez JM, Benito R, Montano A, et al. Next-generation sequencing and FISH studies reveal the appearance of gene mutations and chromosomal abnormalities in hematopoietic progenitors in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of hematology & oncology*. 2017;10(1):83.
31. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131(25):2745-60.
32. Nabhan C, Rosen ST. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical review. *Jama*. 2014;312(21):2265-76.
33. Alikhan M.B., Venkataraman G. (2018) Morphology and Immunophenotype of Chronic Lymphocytic Leukemia. In: Wiernik P., Dutcher J., Gertz M. (eds) *Neoplastic Diseases of the Blood*. Springer, Cham.
34. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*. 2002;99(11):4087-93.
35. Delgado J, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Campo E. Genetic evolution in chronic lymphocytic leukaemia. *Best practice & research Clinical haematology*. 2016;29(1):67-78.
36. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer cell*. 2010;17(1):28-40.
37. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends in immunology*. 2013;34(12):592-601.
38. Wiestner A. The role of B-cell receptor inhibitors in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(12):1495-507.
39. Stevenson FK, Forconi F, Packham G. The meaning and relevance of B-cell receptor structure and function in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in hematology*. 2014;51(3):158-67.
40. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton LA, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer research*. 2014;74(16):4211-6.

41. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526(7574):525-30.
42. S. M. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer. ISBN 978-1-4614-8050-1.
43. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American journal of hematology*. 2017;92(9):946-65.
44. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994;8(10):1640-5.
45. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American journal of clinical pathology*. 1997;108(4):378-82.
46. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-34.
47. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198-206.
48. Parikh SA, Shanafelt TD. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in oncology*. 2016;43(2):233-40.
49. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840-7.
50. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-54.
51. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nuckel H, et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(9):897-904.
52. Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND, Tschumper RC, Witzig TE, Nowakowski GS, et al. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *British journal of haematology*. 2008;140(5):537-46.
53. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111(2):865-73.
54. Buccheri V, Barreto WG, Fogliatto LM, Capra M, Marchiani M, Rocha V. Prognostic and therapeutic stratification in CLL: focus on 17p deletion and p53 mutation. *Annals of hematology*. 2018;97(12):2269-78.
55. Cavallari M, Cavazzini F, Bardi A, Volta E, Melandri A, Tammiso E, et al. Biological significance and prognostic/predictive impact of complex karyotype in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2018;9(76):34398-412.
56. Puiggros A, Collado R, Calasanz MJ, Ortega M, Ruiz-Xiville N, Rivas-Delgado A, et al. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. *Oncotarget*. 2017;8(33):54297-303.
57. Trbusek M, Smardova J, Malcikova J, Sebejova L, Dobes P, Svitakova M, et al. Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(19):2703-8.
58. Delgado J, Doubek M, Baumann T, Kotaskova J, Molica S, Mozas P, et al. Chronic lymphocytic leukemia: A prognostic model comprising only two biomarkers (IGHV mutational status and FISH cytogenetics) separates patients with different outcome and simplifies the CLL-IPI. 2017;92(4):375-80.

59. The International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology*. 2016;17(6):779-90.
60. Ghia P, Hallek M. Management of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2014;99(6):965-72.
61. Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2018. *Blood cancer journal*. 2018;8(10):93.
62. Woyach JA, Ruppert AS, Heerema NA, Zhao W, Booth AM, Ding W. Ibrutinib Regimens versus Chemoimmunotherapy in Older Patients with Untreated CLL. 2018;379(26):2517-28.
63. Moreno C, Greil R, Demirkan F, Tedeschi A, Anz B, Larratt L, et al. Ibrutinib plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in first-line treatment of chronic lymphocytic leukaemia (iLLUMINATE): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2019;20(1):43-56.
64. Shanafelt TD, Wang XV, Kay NE, Hanson CA, O'Brien S, Barrientos J, et al. Ibrutinib-Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. 2019;381(5):432-43.
65. Wierda WG, Zelenetz AD, Gordon LI, Abramson JS, Advani RH, Andreadis CB, et al. NCCN Guidelines Insights: Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 1.2017. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2017;15(3):293-311.
66. Kater AP, Seymour JF, Hillmen P, Eichhorst B, Langerak AW, Owen C, et al. Fixed Duration of Venetoclax-Rituximab in Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia Eradicates Minimal Residual Disease and Prolongs Survival: Post-Treatment Follow-Up of the MURANO Phase III Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2019;37(4):269-77.
67. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, Fink AM, Tandon M, Dixon M, et al. Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *The New England journal of medicine*. 2019;380(23):2225-36.
68. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-56.
69. Moreno C, Ritgen M, Rawstron A. Is MRD eradication a desirable goal in CLL? Best practice & research Clinical haematology. 2010;23(1):97-107.
70. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Bottcher S, Ghia P, Zehnder JL, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2007;21(5):956-64.
71. Rawstron AC, Bottcher S, Letestu R, Villamor N, Fazi C, Kartsios H, et al. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia*. 2013;27(1):142-9.
72. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Villamor N, Letestu R, Nomdedeu J, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia*. 2016;30(4):929-36.
73. Ghia P, Rawstron A. Minimal residual disease analysis in chronic lymphocytic leukemia: a way for achieving more personalized treatments. *Leukemia*. 2018;32(6):1307-16.
74. Kwok M, Rawstron AC, Varghese A, Evans PA, O'Connor SJ, Doughty C, et al. Minimal residual disease is an independent predictor for 10-year survival in CLL. *Blood*. 2016;128(24):2770-3.

75. Varghese AM, Rawstron AC, Hillmen P. Eradicating minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia: should this be the goal of treatment? *Current hematologic malignancy reports*. 2010;5(1):35-44.
76. European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use (2016) Appendix 4 to the guideline on the evaluation of anticancer medicinal products in man. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/02/WC500201945.pdf.
77. Cheson BD, Bennett JM, Rai KR, Grever MR, Kay NE, Schiffer CA, et al. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the National Cancer Institute-sponsored working group. *American journal of hematology*. 1988;29(3):152-63.
78. Rawstron AC, Kreuzer KA, Soosapilla A, Spacek M, Stehlikova O, Gambell P, et al. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2018;94(1):121-8.
79. Rosenquist R, Rosenwald A, Du MQ, Gaidano G, Groenen P, Wotherspoon A, et al. Clinical impact of recurrently mutated genes on lymphoma diagnostics: state-of-the-art and beyond. *Haematologica*. 2016;101(9):1002-9.
80. Gwyer E, Snelgrove R, Hussell T. The therapeutic potential of positive and negative immune cell co-stimulation during inflammation. *Biochemical Society transactions*. 2006;34(Pt 6):1032-6.
81. Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CR, Maekawa Y, Tamashiro N, Takao TT, et al. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2014;86(2):98-105.
82. Kohnke T, Wittmann VK, Bucklein VL, Lichtenegger F, Pasalic Z, Hiddemann W, et al. Diagnosis of CLL revisited: increased specificity by a modified five-marker scoring system including CD200. *British journal of haematology*. 2017;179(3):480-7.
83. Lesesve JF, Tardy S, Frotscher B, Latger-Cannard V, Feugier P, De Carvalho Bittencourt M. Combination of CD160 and CD200 as a useful tool for differential diagnosis between chronic lymphocytic leukemia and other mature B-cell neoplasms. *International journal of laboratory hematology*. 2015;37(4):486-94.
84. Fan L, Miao Y, Wu YJ, Wang Y, Guo R, Wang L, et al. Expression patterns of CD200 and CD148 in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders and their potential value in differential diagnosis. *Leukemia & lymphoma*. 2015;56(12):3329-35.
85. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-75.
86. Palumbo GA, Parrinello N, Fargione G, Cardillo K, Chiarenza A, Berretta S, et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia research*. 2009;33(9):1212-6.
87. Starostka D, Kriegova E, Kudelka M, Mikula P, Zehnalova S, Radvansky M, et al. Quantitative assessment of informative immunophenotypic markers increases the diagnostic value of immunophenotyping in mature CD5-positive B-cell neoplasms. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2018;94(4):576-87.
88. Challagundla P, Medeiros LJ, Kanagal-Shamanna R, Miranda RN, Jorgensen JL. Differential expression of CD200 in B-cell neoplasms by flow cytometry can assist in diagnosis, subclassification, and bone marrow staging. *American journal of clinical pathology*. 2014;142(6):837-44.
89. Hu Z, Sun Y, Schlette EJ, Tang G, Li S, Xu J, et al. CD200 expression in mantle cell lymphoma identifies a unique subgroup of patients with frequent IGHV mutations, absence of SOX11 expression, and an indolent clinical course. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2018;31(2):327-36.

90. Grier DD, Al-Quran SZ, Cardona DM, Li Y, Braylan RC. Flow cytometric analysis of immunoglobulin heavy chain expression in B-cell lymphoma and reactive lymphoid hyperplasia. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2012;5(2):110-8.
91. Legac E, Chastang C, Binet JL, Michel A, Debre P, Merle-Beral H. Proposals for a Phenotypic Classification of B-Chronic Lymphocytic Leukemia, Relationship with Prognostic Factors. *Leukemia & lymphoma*. 1991;5 Suppl 1:53-8.
92. Gamberale R, Geffner JR, Sanjurjo J, Fernandez-Calotti PX, Arrosagaray G, Sanchez Avalos J, et al. Expression of Fcγ receptors type II (FcγRII) in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2003;102(7):2698-9.
93. Lim SH, Vaughan AT, Ashton-Key M, Williams EL, Dixon SV, Chan HT, et al. Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. *Blood*. 2011;118(9):2530-40.
94. Bosch F, Villamor N. ZAP-70 expression in CLL: a new parameter for an old disease. *Haematologica*. 2003;88(7):724-6.
95. Rossi FM, Del Principe MI, Rossi D, Irno Consalvo M, Luciano F, Zucchetto A, et al. Prognostic impact of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia: mean fluorescence intensity T/B ratio versus percentage of positive cells. *Journal of translational medicine*. 2010;8:23.
96. Boonstra JG, van Lom K, Langerak AW, Graveland WJ, Valk PJ, Kraan J, et al. CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2006;70(3):136-41.
97. Baumann T, Delgado J, Santacruz R, Martinez-Trillos A, Rozman M, Aymerich M, et al. CD49d (ITGA4) expression is a predictor of time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukaemia and mutated IGHV status. *British journal of haematology*. 2016;172(1):48-55.
98. Vaughan AT, Iriyama C, Beers SA, Chan CH, Lim SH, Williams EL, et al. Inhibitory FcγRIIb (CD32b) becomes activated by therapeutic mAb in both cis and trans and drives internalization according to antibody specificity. *Blood*. 2014;123(5):669-77.
99. Brenner H, Gondos A, Pulte D. Trends in long-term survival of patients with chronic lymphocytic leukemia from the 1980s to the early 21st century. *Blood*. 2008;111(10):4916-21.
100. Daniele G, L'Abbate A, Turchiano A, Palumbo O, Carella M, Lo Cunsolo C, et al. 1q23.1 homozygous deletion and downregulation of Fc receptor-like family genes confer poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical and experimental medicine*. 2019;19(2):261-7.
101. Holmannova D, Kolackova M, Kondelkova K, Kunes P, Krejsek J, Andrys C. CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part I: CD200/CD200R structure, activation, and function. *Acta medica (Hradec Kralove)*. 2012;55(1):12-7.
102. Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, Ravey EP, McWhirter J, Oltean D, et al. CD200 expression on tumor cells suppresses antitumor immunity: new approaches to cancer immunotherapy. *Journal of immunology*. 2007;178(9):5595-605.
103. Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, Ruella M. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. 2016;127(9):1117-27.
104. Yin Q, Sivina M, Robins H, Yusko E, Vignali M, O'Brien S, et al. Ibrutinib Therapy Increases T Cell Repertoire Diversity in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. 2017;198(4):1740-7.
105. Schliffke S, Akyuz N, Ford CT, Mahrle T, Thenhausen T, Krohn-Grimberghe A, et al. Clinical response to ibrutinib is accompanied by normalization of the T-cell environment in CLL-related autoimmune cytopenia. *Leukemia*. 2016;30(11):2232-4.

ANEXOS

Tabla suplementaria 1. Anticuerpos monoclonales usados en rutina diagnóstica.

Surface marker	Clone/s	Source
CD8,CD19/CD3,CD56/CD4	UCH-T4,HIB19/UCH-T1,C5.9/RPA-T4	Lymphogram™ (Cytognos)
K/λ/CD19	B28-2/1-155-2/SJ25C1	BD Oncomark™ (BD)
CD200	MRC OX-104	BD Pharmingen™ (BD)
CD5	L17F12	BD Pharmingen™ (BD)
FMC7	FMC7	BD Pharmingen™ (BD)
CD19	HIB19	BD Pharmingen™ (BD)
CD23	EBVCS 5	BD Pharmingen™ (BD)
CD79b	3A2-2E7	BD Pharmingen™ (BD)
CD22	S-HCL-1	BD Pharmingen™ (BD)
CD20	L27	BD Pharmingen™ (BD)
CD10	HI10a	BD Pharmingen™ (BD)
CD38	HB7	BD Pharmingen™ (BD)

Supplementary Table I, *Mora A et al. Cytometry B Clin Cytom. 2019*

Tabla suplementaria 2. Espectro de la expresión inmunofenotípica de los pacientes con Leucemia Linfática Crónica atípica (n=16).

Case No.	SmIg ^{weak}	FMC7 ⁻	CD5 ⁺	CD23 ⁺	CD79b ⁻	MS score	CD200 ⁺
1	0	1	1	1	0	3	1
2	0	1	1	1	0	3	1
3	0	1	1	1	0	3	1
4	0	1	1	1	0	3	1
5	0	1	1	1	0	3	1
6	0	0	1	1	1	3	1
7	0	0	1	1	1	3	1
8	0	1	1	1	0	3	1
9	0	1	1	1	0	3	1
10	0	0	1	1	0	2	1
11	0	0	1	1	0	2	1
12	0	1	1	0	0	2	1
13	0	0	1	1	0	2	1
14	0	0	1	1	0	2	1
15	0	0	1	1	0	2	1
16	0	0	1	0	0	1	1

Supplementary Table II, *Mora A et al. Cytometry B Clin Cytom. 2019*

Tabla Suplementaria III. Características clínicas y biológicas de los pacientes de LLC al diagnóstico.

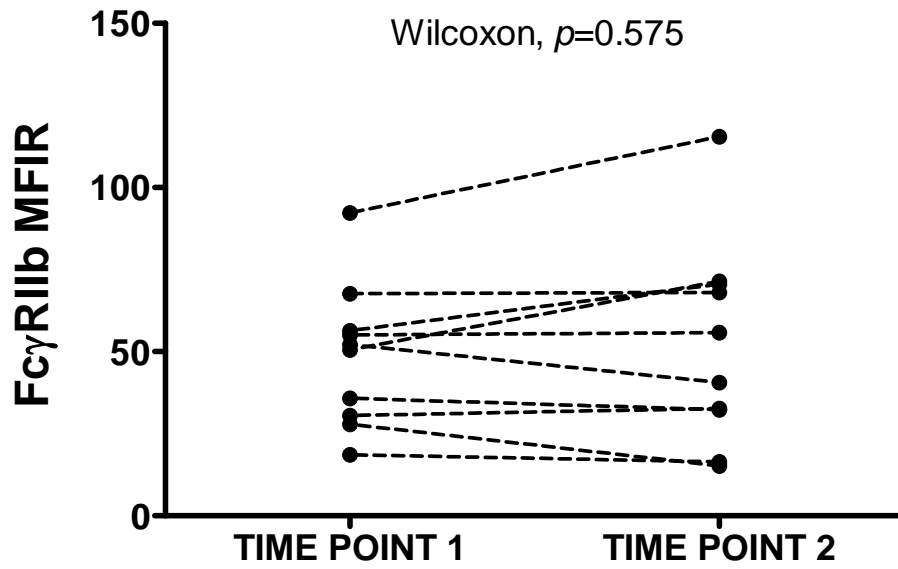
	CLL (n=155)
Median age (years)	68.7 (40.3-88.6)
Median follow-up (years)	6.5 (0-15.0)
Gender (n, %)	
Female	75/155 (46.5)
Male	83/155 (53.5)
Binet stage (n, %)	
A	155/155 (100)
Median lymphocyte count (x10⁹/l)	11.0 (5.1-87.3)
Median Hb (g/l)	140 (87-171)
Median platelet count (x10⁹/l)	200 (87-560)
LDH elevated (n, %)	10/146 (7)
B2M elevated (n, %)	43/125 (34)
IGHV mutational status (n, %)	
Mutated	84/128 (66)
Unmutated	44/128 (34)
Cytogenetics (n, %)	
Del(17p)	1/127 (1)
Del(11q)	13/127 (10)
Del(13q)	54/127 (42)
+12	16/127 (13)
No aberrations	43/127 (34)
CD38 (n, %)	
<30%	111/147 (75.5)
≥ 30%	36/147 (24.5)
CD49d (n, %)	

<30%	120/155 (77)
≥ 30%	35/155 (23)
ZAP70 (n, %)	
<20%	88/129 (68)
≥20%	41/129 (32)

Hb, hemoglobin; LDH, lactatedeshydrogenase; B2M, beta-2 microglobulin.

Supplementary Table I, *Bosch R. et al. Leuk Lymphoma. 2017.*

Figura Suplementaria 1. Niveles de expresión de FcγRIIb en muestras pareadas recogidas a diferentes tiempos antes del tratamiento.



Supplementary Figure 1, *Bosch R. et al. Leuk Lymphoma. 2017.*

