

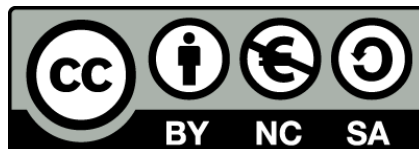


UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Combinació de tècniques citogenètiques en la leucèmia limfàtica crònica

Estudi de l'heterogeneïtat dels pacients i aplicabilitat  
a la pràctica clínica

Anna M.Puiggros Metje



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- NoComercial – Compartirlqual 4.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - NoComercial – Compartirlqual 4.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.

# Combinació de tècniques citogenètiques en la leucèmia limfàtica crònica

Anàlisi de l'heterogeneïtat dels pacients i aplicabilitat a la pràctica clínica



Anna M. Puiggros Metje





Universitat  
de Barcelona



Combinació de tècniques d'anàlisi citogenètica en la leucèmia limfàtica crònica:  
estudi de l'heterogeneïtat dels pacients i aplicabilitat a la pràctica clínica

Memòria presentada per Anna Maria Puiggros Metje  
per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció de la Dra. Blanca Espinet Solà  
i el Dr. Francesc Solé Ristol, al Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies  
Hematològiques de l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM),  
i la tutorització del Dr. Bru Cormand Rifà del Departament de Genètica de la  
Universitat de Barcelona

Anna Maria Puiggros Metje  
Barcelona 2015

Vist i plau de la Directora de Tesi

Vist i plau del Co-director de Tesi

Dra. Blanca Espinet Solà

Dr. Francesc Solé Ristol

Vist i plau del Tutor Tesi

Programa de doctorat: Genètica

Dra. Bru Cormand Rifà



# Agraïments

S'acosta el final d'aquest periple... només queda escriure els agraïments i podré donar per acabada l'escriptura de la tesi! I és aquí quan pares un moment i reflexiones en tot el que he viscut durant aquests anys, en com moments de tots tipus han fet possible que una llicenciada recent sortideta del forn i sense massa idea de cap on la portaria el seu futur professional pogués créixer com a persona i citogenetista! Però sobretot, és aquí quan t'adones de la sort que una té de poder comptar amb un munt de gent que de manera més o menys directa ha fet possible que aquesta aventura arribi al final!

Primerament, els meus directors de tesi, Kiko i Blanca, que des del primer moment van confiar en mi per endinsar-se al món de les LLC i fer créixer l'equip de citogenètica. Blanca, sembla mentida ja podrem "enterrar un altre mort" com a mi m'agrada! Quantes hores de bases de dades, mails, divagacions i llistes interminables de deures que han sortit d'aquesta tesi! Tot i que admeto que m'ha quedat una cosa pendent... potser com a Dra. seré capaç de trobar el moment d'ensenyar-te tots els codis de teclat pel PC!! : )

L'equip de citogenètica... que sempre heu estat aquí pel que fes falta, de becària i encara més com a adjunta! Carme i María, moltes gràcies per tot el suport tant tècnic com moral... m'agraden els vostres "tu tranquil·la que ho tenim controlat" quan em quedo "sola ante el peligro". I Mery... l'hereva de les becàries... moltes gràcies per ajudar-nos a processar totes les LLC quan estem amb l'aigua fins al coll! Espero que finalment l'excusa de la tesi serveixi per fer un "tiki-tiki" com cal! Dra Marta Salido... digne companya de despatx (ara la meva part del cartellet de la porta també serà veritat!), gràcies per alegrar la Kikera i per haver estar (o ser) la meva teacher amb els cariotips i el FISH! Un plaer defensar la rutina mano-a-mano amb tu, i poder fer les birretes/teràpia post-feina també ;)

També vull agrair a tota la resta de l'equip, sense el granet de sorra de cadascú tot aquest treball no seria possible! Les citòlogues, Lourdes, Encarna, Leo, Ana i Dra Woesner... un plaer compartir nacionals, sessions i casos amb vosaltres! Gràcies per les correccions i per aportar-nos una visió més clínica als nostres treballs, presentacions o quan calgui! També el Xavi, l'últim fixatge de citologia... merci per la companyia a altes hores de la tarda, encara ens queda molt per discutir amb les "nostres poblacions T"... I no m'oblido de les tècnics i de la "vidilla" que donen al laboratori! Rosa i Bea, merci pel que m'heu ensenyat i per no apagar-nos el citòmetre!! ;) Montse, a vegades quasi ni ens veiem passar, però sé que tinc la "padrineda" al laboratori pendent per ajudar-me amb que faci falta...s'agraeix molt!! També vull recordar-me de la Rosa Mari, que era la resposta a totes les preguntes que les becàries no sabíem respondre... va ser un plaer aprendre de les teves explicacions,

se't troba a faltar! I les secres... Anna i Asun, sabeu que quan la lio al IMASIS.... ho faig perquè no em trobeu a faltar ;) També a tot l'equip de Biologia Molecular i d'Anatomia Patològica, i al Dr. Serrano per haver confiat en mi per formar-ne part. També m'agradaria donar les gràcies a tota la gent d'Hemato Clínica, especialment a l'Eugènia i l'Eva, gràcies per la vostra col·laboració, per ajudar-nos a obtenir les mostres i la paciència amb els nostres correus setmanals repassant el dispensari.... :)

Noies del SAM... Lara, Eulàlia i Marta! Moltes gràcies a nivell professional, un plaer treballar amb vosaltres! Arrays genòmics, d'expressió.... haurem de buscar què més teniu en oferta per seguir la saga ;) Però també a nivell personal, la vida pel PRBB... es troben a faltar les converses de passadís i les visites al despatx veí, on sempre tenen alguna cosa de xocolata!!

I les becàries... tant les que em van ensenyar, com els becaris de noves generacions!! Rocío, Ana, Sílvia i Mar.... merci apadrinar a una "becària novata" com a una més! Arribar a un lloc així no té preu!! Mallo! La veterana que va guiar-nos en la nostra mudança al PRBB... merci per escoltar les meves mil historietes i pels riures al despatx 164, ja ho saps que "SENSE TU..... ;)" i l'altra companya de despatx.... la Vera! Una sort poder començar amb algú com tu... els nostres dubtes existencials al laboratori, congressos... encara me'n recordo l'eufòria que ens va agafar el dia del FIS :) Se us troba a faltar...a l'IJC tenen moltíssima sort de tenir-vos per allà! La Sílvia Saumell, la nostra citòloga/becària, merci per tot i les xerrades de despatx, en res et tocarà a tu tot això!! I l'Anna Calull, la meva compi durant "la transició"... vas passar de becària nova a veterana en 4 dies, però vas estar més que a l'alçada! Estic segura que Mèxic a guanyat una gran citogenetista en potència! I finalment a les noves generacions... al Sergi merci per la teva energia i bon rotllo, en un tres i no res ets capaç de baixar i esvalotar-nos tot el Galliner!! I Gonzalo! Eres un digne sucesor, sobreviurem a nuestras crisis de estrés máximo....estoy segura que al equipo LLC nos queda muuuucho recorrido ;)

Gràcies a la Fundació IMIM per l'ajuda en l'enquadernació de la tesi.

I com no... els meus biometges! Aida, Tanit, Pablo, Dani, Marina, Miguel i Josep... definitivament sou el millor que m'he endut d'aquell màster! Aquests anys han donat per molt...alguns més hiperactius que altres! :p i les nostres quedades setmanals... ideals per donar una mica d'aire al ritme frenètic de les nostres tesis! I les noves incorporacions... David, Jeudiel i Ignasi, algun dia aconseguiré entendre aquest idioma informàtic que utilitzeu!! En serio, sou tots uns cracks ^^ També les meves nenes de biotec! Anna, Gemma, Sara, Laura i Núria! Cadascú

ha tirat pel seu camí i ens veiem poc... però s'agraeix poder seguir tenint aquesta sintonia i bon rotllo cada cop que ens veiem! Sembla mentida que ara siguem aquí, quan fa 4 dies érem a la gespeta de l'Autònoma! Merci per tot el que hem viscut i per ser com sou!!

I tornant a la meva terra.... la colla de Girona! Tania, Gemma P, Mariona, Raquel, Toni, Lluís, Núria, Héctor, Àngel, Gemma F i Arnau! També n'hem viscut de tots colors... anècdotes per parar un tren! Merci per ser al meu costat durant tots aquests anys i per aguantar-me el rotllo malgrat no entendre massa bé què em dedico a fer... el vostra resum de "ets la jefa" no té desperdici! Us estimo un piló! I en aquest cas... moltíssimes gràcies a la Gemma i l'Arnau per la maquetació de la tesi, heu fet un currasso monumental!

Adriana, ens veiem menys del que ens agradaria, però gràcies per aquesta amistat com n'hi ha poques, i per ajudar-me amb les meves preses de decisions quan fa falta!! ;)

Moltíssimes gràcies també a l'Oriol! Crec que deus ser una de les persones que més has hagut d'aguantar el meu dia a dia amb aquesta tesi... les nostres teràpies quan arribava al piset a les tantes i els teus soparillos per recuperar-me del meu estat "oruga" del sofà no tenen preu! Sempre tindrè un magnífic record dels nostres anys de convivència!

També vull donar les gràcies als meus pares, per tot el que m'han donat i m'han ensenyat, i pel seu suport incondicional! Marta i Jordi, ja veieu que us faig casi vaig fent carrera per poder mantenir aquest nen tant maco que m'heu donat :P Merci per tot i per haver-me donat el plaer de ser tieta d'en Marc petit! I no m'oblido d'en Marc gran! Gràcies per haver escoltar-me i entendre'm, crec que en aquest temps has fet un "cursillo" accelerat de citogenètica! Els moments de desconexió amb tu són una injecció d'energia impressionant, no els canviaria per res del món!

Finalment també m'agradaria agrair a tots membres dels grups cooperatius que participen a la base de dades de LLC/LBM i que han permès la realització d'alguns dels treballs d'aquesta tesi. I per últim, a tots els pacients i a familiars que accepten col·laborar amb la investigació que duem a terme, sense els quals aquesta no seria possible.





# Índex

Llistat d'Abreviatures	V
Llistat de Taules i Figures	VIII
Introducció	1
1. Leucèmia limfàtica crònica	2
1.1. Introducció i epidemiologia	2
1.2. Diagnòstic	2
1.2.1. Recompte i morfologia limfocitària en sang perifèrica	2
1.2.2. Immunofenotip	3
1.3. Factors pronòstic de la LLC	5
1.3.1. Estadis clínics	5
1.3.2. Marcadors sèrics	7
1.3.3. Alteracions citogenètiques	8
1.3.4. Estat mutacional de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines ( <i>IGHV</i> )	9
1.3.5. Expressió de CD38, ZAP-70 i CD49d	9
1.4. Tractament de la LLC	11
1.4.1. Criteris de tractament	11
1.4.2. Estratègies terapèutiques actuals en LLC	12
2. Tècniques d'anàlisi genètica aplicades a la LLC	14
2.1. Citogenètica convencional (CC)	14
2.2. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH)	15
2.2.1. Tipus de sondes	17
2.2.2. Sondes no comercials	20
2.3. <i>Microarrays</i> genòmics	20
2.4. Seqüenciació directa de Sanger	23
3. Alteracions genètiques de la LLC	24
3.1. Alteracions recurrents amb valor pronòstic conegut en LLC	24
3.1.1. Deleció 13q14	24
3.1.2. Trisomia 12	26
3.1.3. Deleció 11q	28
3.1.4. Deleció 17p	30
3.2. Altres alteracions detectades per citogenètica convencional	32
3.2.1. Translocacions cromosòmiques	33

3.2.2.	Cariotip complex	35
3.3.	Alteracions genòmiques detectades per <i>microarrays</i>	35
3.4.	Alteracions detectades amb noves tecnologies; perspectives de futur en LLC	39
	<b>Hipòtesis i Objectius</b>	<b>43</b>
	<b>Resultats</b>	<b>47</b>
	<b>1. Article 1:</b> Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion	51
	Resultats annexos	65
	<b>2. Article 2:</b> Interstitial 13q14 deletions detected in the karyotype and translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia ( <i>CLL</i> ): Different genetic mechanisms but equivalent poorer clinical outcome	71
	Resultats annexos	85
	<b>3. Article 3:</b> Genomic arrays in chronic lymphocytic leukemia routine clinical practice: are we ready to substitute conventional cytogenetics and fluorescence <i>in situ</i> hybridization techniques?	89
	Resultats annexos	103
	<b>Discussió</b>	<b>115</b>
1.	Característiques dels pacients amb LLC i deleció de 13q	118
1.1.	Valor pronòstic de les característiques citogenètiques de la deleció de 13q aïllada per FISH	118

1.1.1.	Impacte pronòstic del percentatge de nuclis amb deleció de 13q per FISH	118
1.1.2.	Impacte pronòstic de la pèrdua bial·lèlica de 13q	119
1.2.	Valor pronòstic de la detecció d'anomalies a la regió 13q14 per citogenètica convencional	124
1.2.1.	Translocacions de 13q14: característiques, cariotip i associació a deleció 13q	124
1.2.2.	Diferències entre els pacients amb alteracions de 13q14 per CC [t(13q) o i-del(13q)] i aquells amb deleció de 13q únicament per FISH [F-del(13q)]	125
1.2.2.1.	Característiques de la deleció 13q per FISH	125
1.2.2.2.	Concomitància d'altres alteracions genètiques amb valor pronòstic	129
1.2.2.3.	Característiques clínico-biològiques al diagnòstic i evolució clínica	129
2.	Utilitat de la tècnica de microarrays genòmics respecte la citogenètica convencional i el FISH per a la detecció d'alteracions cromosòmiques a la pràctica clínica de la LLC	132
2.1.	Taxa de detecció d'anomalies de les diferents tècniques	132
2.2.	Detecció d'alteracions recurrents en LLC incloses al panell de FISH de rutina	133
2.3.	Detecció d'altres alteracions no incloses al panell de FISH de rutina	135
3.	Avantatges i inconvenients de les diferents tècniques d'anàlisi citogenètica en LLC	140
	Conclusions	145
	Bibliografia	149



# Abreviacions

## **ACAT**

Acetyl-CoA  
acetyltransferase 1

## **ADN**

Àcid desoxiribonucleic

## **ARN**

Àcid ribonucleic

## **ATM**

Ataxia telangiectasia  
mutated

## **B2M**

β2-microglobulina

## **BAC**

Bacterial artificial  
chromosome

## **BAX**

BCL2-associated X protein

## **BCL2**

B-cell CLL/lymphoma 2

## **BCL3**

B-cell CLL/lymphoma 3

## **BCR**

Receptors de cèl·lula B

## **BIRC3**

Baculoviral IAP repeat  
containing 3

## **BSG**

Basigin (o inductor de la  
metaloproteïna de la  
matriu)

## **BTK**

Bruton agammaglobuline-  
mia tyrosine kinase

## **CC**

Citogenètica convencional  
amb bandes G

## **CDK4**

Cyclin-dependent kinase 4

## **CUL5**

Culin 5

## **DAPI**

4',6-diamino-2-fenilindol

## **ddNTP**

Didesoxinucleòtid trifosfat

## **DLEU2**

Deleted in lymphocytic  
leukemia, 2

## **DLEU7**

Deleted in lymphocytic  
leukemia, 7

## **dNTP**

Desoxinucleòtid trifosfat

## **DUPa**

Disomia uniparental  
adquirida

## **E2F1**

E2F transcription factor 1

## **FBXW7**

F-box and WD repeat  
domain containing 7, E3

ubiquitin protein ligase

## **FC**

Fludarabina-  
ciclofosfamida

## **FCR**

Fludarabina-  
ciclofosfamida-rituximab

## **FISH**

Hibridació *in situ*  
fluorescent

## **FITC**

Isotiocianat de  
fluoresceïna

## **GCECGH**

Grupo Cooperativo  
Español de Citogenética  
Hematológica

## **GELL**

Grupo Español de  
Leucemia Linfática  
Crónica

## **GPI**

Glucose-6-phosphate  
isomerase

## **H2AX**

H2A histone family,  
member X

## **HGC**

Hibridació genòmica  
comparada

**HIP1R***Huntingtin interacting protein 1 related***IGH**

Cadena pesada de les immunoglobulines

**IGHV**

Regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines

**ISCN***International System for Human Cytogenetics Nomenclature***KDELC2***KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 2***LB**

Luria-Bertoni

**LBM**

Limfocitosi B monoclonal

**LDH**

Lactat deshidrogenasa

**LGALS1***Lectin, galactoside-binding, soluble, 1***LLC**

Leucèmia limfàtica crònica

**LLCP**

Limfoma limfocític de

cèl·lules petites

**LOH**Pèrdua d'heterozigositat (de l'anglès *loss of heterozygosity*)**MDM2***MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase***MHC**

Complex major d'histocompatibilitat

**miARNs**

Micro ARN

**MRE11***MRE11 meiotic recombination 11 homolog A***MSH2***MutS homolog 2***MYC***v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog***MYCN***v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog***MYD88***Myeloid differentiation primary response gene 88***MYF6***Myogenic factor 6 (herculin)***NGS***Next generation sequencing***NPAT***Nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus***OMS**

Organització Mundial de la Salut

**P2RY14***Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14***PAC***P1-derived artificial chromosome***PAK2***p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2***PARVB***Parvin, beta***PI3K**

Fosfoinositol 3-quinases

**RAB39***RAB39, member RAS oncogene family***RB1***Retinoblastoma*

**RDX***Radixin***REL***v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog***R-FC***Fludarabina-cladribina-rituximab***SF3B1***Splicing factor 3b, subunit 1***SG***Supervivència global***SNP***Single nucleotide polymorphism***sTK***Timidina quinasa sèrica***SYK***Spleen tyrosine kinase***TP53***Tumor protein p53***TPA***12-tetradecanoilforbol-13-acetat***TPT***Temps fins al primer tractament***TtFT***Incidència acumulada de tractament als cinc anys***VIM***Vimentin***YAC***Yeast artificial chromosome***ZAP-70***Zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa*



## Figures

**Figura 1.** Limfòcit B característic de la LLC

**Figura 2.** Gràfics obtinguts a l'estudi immunofenotípic típic d'un pacient amb LLC

**Figura 3.** Supervivència global de la LLC en funció dels estadis Rai i Binet (Adaptat de Cramer *et al*, 2011)

**Figura 4.** Supervivència global en la LLC segons les categories citogenètiques establertes per l'algorisme de Döhner i col·laboradors l'any 2000 (Döhner *et al*, 2000; imatge adaptada de Cramer *et al*, 2011)

**Figura 5.** Esquema dels nous tractaments desenvolupats en LLC dirigits a dianes de la via del BCR (Hallek *et al*, 2013)

**Figura 6.** Etapes de la tècnica de FISH (Adaptat de Speicher i Carter, 2005)

**Figura 7.** Principals sondes de FISH (Adaptat de McNeil i Ried, 2000)

**Figura 8.** Tipus de sondes de *locus* específic per a la detecció de reordenaments cromosòmics

**Figura 9.** Esquema del procés bàsic dels *microarrays* d'HGC i dels *microarrays* de SNPs

**Figura 10.** Esquema del procés de seqüenciació automàtica de l'ADN (Adaptat de Nelson i Cox, 2006)

**Figura 11.** Esquema de les alteracions de 13q14 recurrents en LLC

**Figura 12.** Esquema de la trisomia 12

**Figura 13.** Esquema de la deleció de la regió 11q en LLC

**Figura 14.** Esquema de la deleció de la regió 17p en LLC

**Figura 15.** Esquema del guany de la regió 2p

**Figura 16.** Esquema de les alteracions del cromosoma 8 descrites en LLC

**Figura 17.** Supervivència global i supervivència lliure de tractament segons el model pronòstic integrat de dades mutacionals i citogenètiques (Adaptat de Rossi *et al*, 2013)

**Figura 18.** Esquema de les diferències al pronòstic dels grups estudiats al treball 2

**Figura 19.** Factors que determinen la detecció d'alteracions grans (>10Mb) per CC i/o per Cyto-arrays

# Taules

**Taula 1.** Criteris de classificació de l'estadiatge de Rai (Rai *et al*, 1975)

**Taula 2.** Criteris de classificació de l'estadiatge de Binet (Binet *et al*, 1981)

**Taula 3.** Taula resum dels principals factors pronòstics en la LLC

**Taula 4.** Comparació de les tècniques d'anàlisi citogenética (Adaptat de Maciejewski *et al*, 2009)

**Taula 5.** Principals gens recurrentment mutats en LLC

**Taula 6.** Resum de les principals publicacions d'anàlisi de l'impacte pronòstic de la deleció del(13q) als pacients amb LLC

**Taula 7.** Resum de les principals publicacions sobre les característiques de les t(13q) en LLC

**Taula 8.** Resum de les principals publicacions d'anàlisi per *microarrays* genòmics en LLC

[The page contains extremely faint, illegible text that appears to be bleed-through from the reverse side of the paper. No specific content can be transcribed.]

# Introducció

Leucèmia limfàtica crònica

Tècniques d'anàlisi genètica aplicades a la LLC

Alteracions genètiques de la LLC

# 1. Leucèmia limfàtica crònica

## 1.1. Introducció i epidemiologia

La leucèmia limfàtica crònica (LLC) és una neoplàsia caracteritzada per l'acumulació de limfòcits B madurs de mida petita i fenotip anòmal en sang perifèrica, medul·la òssia, ganglis limfàtics i altres teixits limfoides (Zenz *et al*, 2010a). La LLC és la leucèmia més comú de la població adulta als països occidentals i afecta principalment a majors de 50 anys, amb una edat mitjana al diagnòstic de 72 anys (DeSantis *et al*, 2014). És una entitat clínicament molt heterogènia, tant en la presentació inicial com en el curs clínic. En la majoria de casos es diagnostica de forma casual essent asimptomàtics, i la supervivència mediana és de 10 anys. No obstant, mentre alguns pacients es mantenen estables durant molt temps, altres progressen ràpidament i requereixen tractament. Per aquest motiu, durant les últimes dècades s'ha fet un gran esforç per a la definició de factors pronòstics que permetin una estratificació dels pacients amb LLC segons el risc de progressió que presenten (Cramer *et al*, 2011).

## 1.2. Diagnòstic

La LLC és una entitat que s'engloba dins la categoria de neoplàsies de cèl·lules B madures segons la classificació de la Organització Mundial de la Salut (OMS) publicada l'any 2008 (Swerlow *et al*, 2008). Per establir el diagnòstic diferencial amb altres neoplàsies de cèl·lules B madures és essencial avaluar el recompte limfocitari en sang perifèrica, així com la morfologia i l'immunofenotip de les cèl·lules limfoides circulants (Hallek *et al*, 2008). D'altra banda, tot i que no és imprescindible pel diagnòstic, la informació sobre altres paràmetres com les anomalies citogenètiques també pot ser útil per al diagnòstic diferencial de la LLC amb altres neoplàsies de cèl·lula B madura (ex. identificació d'una t(11;14)(q13;q32) característica del limfoma de cèl·lules del mantell).

### 1.2.1. Recompte i morfologia limfocitària en sang perifèrica

El diagnòstic de LLC requereix la presència d'almenys  $5 \times 10^9/L$  limfòcits B clonals en sang perifèrica. De forma característica, aquests limfòcits són petits, d'aspecte madur i tenen cromatina condensada i citoplasma escàs (Figura 1) (Hallek *et al*, 2008).

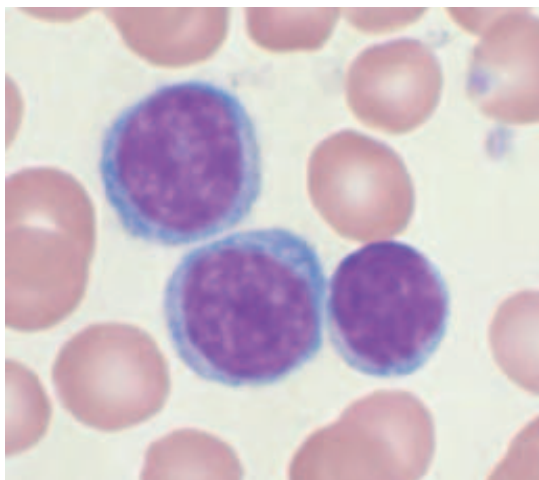


Figura 1. Limfòcit B característic de la LLC

A part del recompte limfocitari, també és essencial realitzar una exploració física i l'avaluació de l'estat general del pacient. Aquesta informació permet distingir la LLC de dues entitats clínicament diferents que presenten limfòcits circulants de característiques idèntiques als limfòcits típics de LLC:

— Limfocitosi B monoclonal (LBM) de fenotip LLC:

Es defineix com la presència de limfòcits B clonals de característiques típiques de LLC en individus sans. Aquests han de ser detectats a nivells inferiors a  $5 \times 10^9/L$  a sang perifèrica, i en absència d'adenopaties, organomegàlies, citopènies o altres símptomes associats a la malaltia (Hallek *et al*, 2008). S'ha descrit que la LBM pot suposar una entitat pre-leucèmica de la LLC, amb una taxa de progressió a LLC que requereixen tractament del 1-2% anual (Shanafelt *et al*, 2009).

— Limfoma limfocític de cèl·lules petites (LLCP):

Es defineix com la presència de d'adenopaties i/o esplenomegàlia, amb menys de  $5 \times 10^9/L$  limfòcits B clonals a sang perifèrica. En el cas del LLCP, es recomana una revisió histopatològica de les adenopaties per confirmar-ne el diagnòstic (Hallek *et al*, 2008).

### 1.2.2. Immunofenotip

Les cèl·lules de la LLC presenten una expressió dèbil dels marcadors de cèl·lula B CD20, CD22, CD79b i de les cadenes lleugeres de les immunoglobulines de superfície. A més, expressen de forma aberrant l'antigen de cèl·lula T CD5, i també expressen els antigens CD200 i CD23. Cada clon de cèl·lules leucèmiques presenta restricció en l'expressió de cadenes lleugeres de les immunoglobulines de

superfície, kappa o lambda (Figura 2) (Hallek *et al*, 2008). Alguns pacients poden presentar un immunofenotip atípic de LLC, amb variacions com negativitat pel marcador CD5 o CD23, o una expressió intensa de les immunoglobulines de superfície o CD20, entre altres (Criel *et al*, 1999).

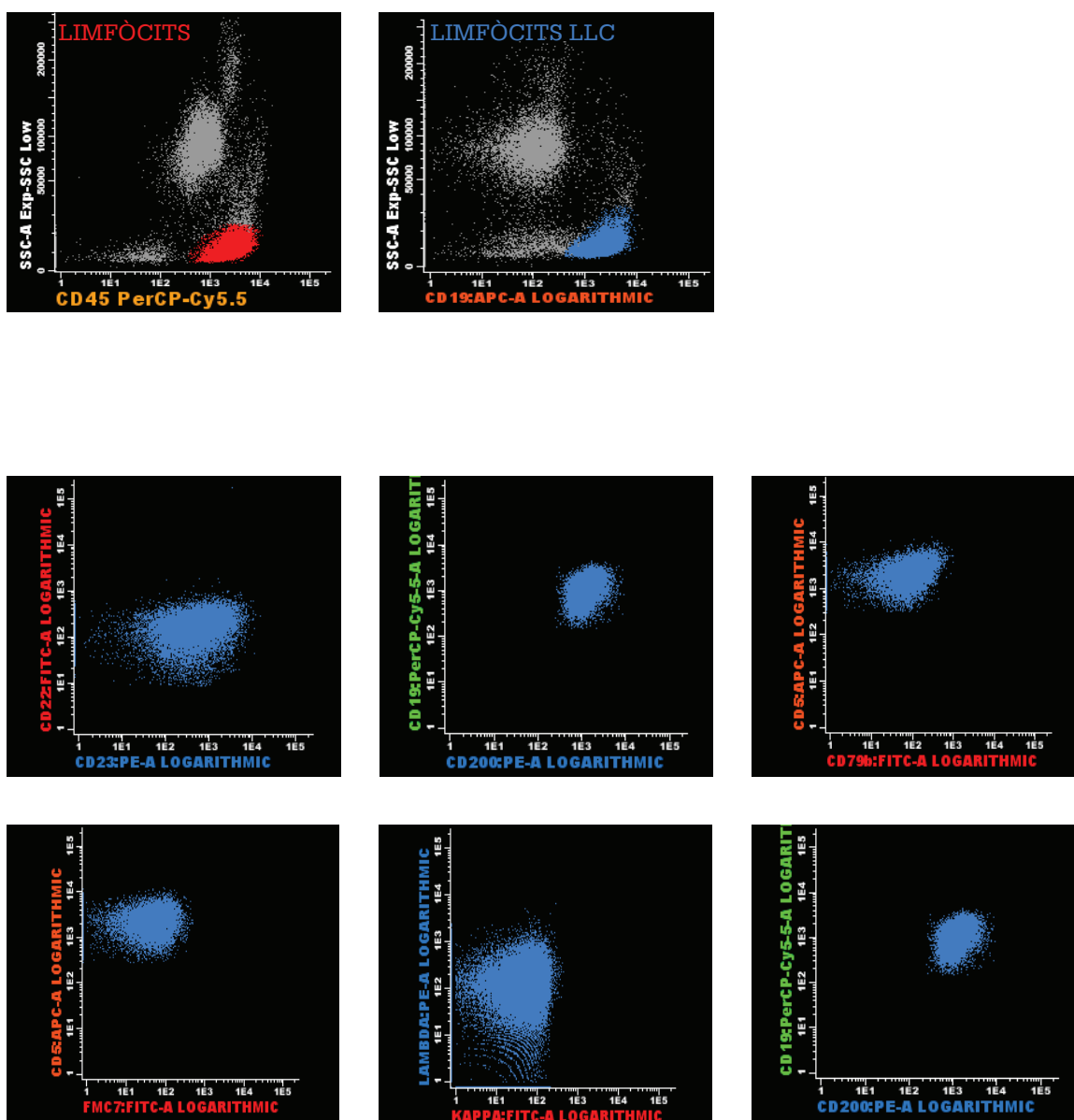


Figura 2. Gràfics obtinguts a l'estudi immunofenotípic típic d'un pacient amb LLC

## 1.3. Factors pronòstics

### 1.3.1. Estadis clínics

Els sistemes d'estadiatge clínic utilitzats en la LLC són els definits per Rai (Rai *et al*, 1975) i Binet (Binet *et al*, 1981). Ambdós són sistemes senzills i d'aplicació fàcil que permeten establir grups de risc basats en l'exploració física, així com en la presència d'anèmia o trombocitopènia (Taules 1 i 2).

Estadi	Característiques clíniques i analítiques
0	- No adenopaties - No hepatomegàlia ni esplenomegàlia - Xifres de plaquetes i hemoglobina normals
I	- <b>Adenopaties</b> en un o més territoris - No hepatomegàlia ni esplenomegàlia - Xifres de plaquetes i hemoglobina normals
II	- No adenopaties - <b>Hepatomegàlia i/o esplenomegàlia</b> - Xifres de plaquetes i hemoglobina normals
III	- <b>Anèmia</b> (hemoglobina $\leq 11\text{g/dL}$ )
IV	- <b>Trombocitopènia</b> (plaquetes $\leq 100 \times 10^9/\text{L}$ )

Taula 1. Criteris de classificació de l'estadiatge de Rai (Rai *et al*, 1975)

Estadi	Característiques clíniques i analítiques
A	- <b>Adenopaties en <math>\leq 2</math> territoris</b> - Xifres de plaquetes i hemoglobina normals
B	- <b>Adenopaties en 3 o més territoris</b> - Xifres de plaquetes i hemoglobina normals
C	- <b>Anèmia</b> (hemoglobina $\leq 10\text{g/dL}$ ) i/o - <b>Trombocitopènia</b> (plaquetes $\leq 100 \times 10^9/\text{L}$ )

Taula 2. Criteris de classificació de l'estadiatge de Binet (Binet *et al*, 1981)



L'aplicació d'aquests sistemes d'estadiatge permet l'estratificació pronòstica dels pacients amb LLC en tres categories de risc (Figura 3). La supervivència global d'aquells pacients considerats de risc baix (Binet A o Rai 0) s'estima en 10 anys, mentre que en aquells considerats de risc intermig (Binet B o Rai I-II) és de 5-7 anys, i es redueix fins als 2-3,5 anys en aquells pacients de risc elevat (Binet C o Rai III-IV) (Rai *et al*, 1975; Binet *et al*, 1981). La limitació principal d'aquests sistemes és la incapacitat de predir la progressió en aquells pacients diagnosticats en estadis inicials.

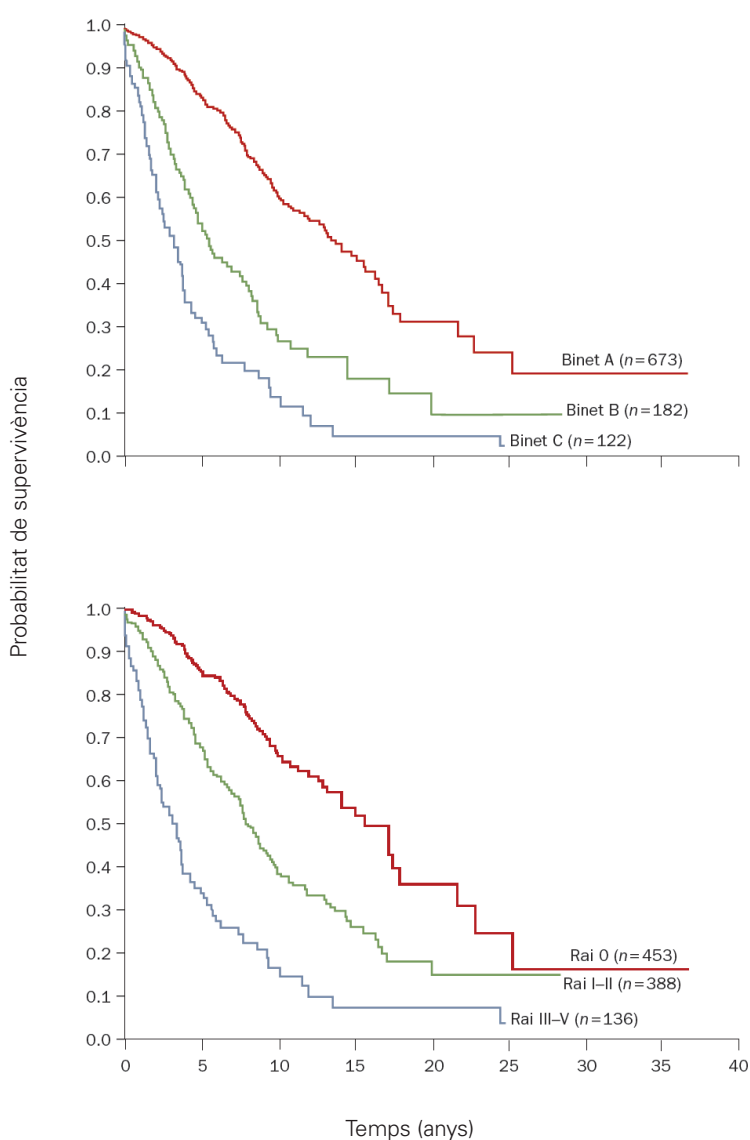


Figura 3. Supervivència global de la LLC en funció dels estadis Rai i Binet (Adaptat de Cramer *et al*, 2011).

### 1.3.2. Marcadors sèrics

Els marcadors sèrics amb valor pronòstic descrits en la LLC són la lactat deshidrogenasa (LDH), la  $\beta$ 2-microglobulina (B2M), la timidina quinasa sèrica (sTK), i el CD23 soluble. Tot i ser una informació fàcil d'obtenir, la seva aplicació a la pràctica clínica ha estat limitada degut a la manca d'estandardització entre laboratoris i a la variabilitat en els valors d'aquests paràmetres degut a factors no relacionats amb la malaltia (ex. infeccions o dèficits de vitamines poden modificar els valors de B2M, o la funció renal interfereix en els valors de sTK) (Cramer *et al*, 2011).

#### — Lactat deshidrogenasa (LDH):

El nivell de LDH és un marcador de la renovació cel·lular en LLC. S'ha descrit que els nivells elevats de LDH ( $\geq 2$  vegades el nivell normal) s'associen de forma independent a una resposta pitjor a règims d'immunoquimioteràpia (fludarabina-ciclofosfamida-rituximab, FCR), i a una supervivència global més curta (Tam *et al*, 2008).

#### — $\beta$ 2-microglobulina (B2M):

És una proteïna extracel·lular que s'uneix de forma no covalent a la cadena  $\alpha$  del complex major d'histocompatibilitat (MHC) de tipus I i II. Els nivells elevats de B2M s'han relacionat a una càrrega tumoral més elevada i a estadis avançats de la malaltia, així com a d'altres factors pronòstics adversos i a supervivència lliure de progressió i supervivència global inferiors (Gentile *et al*, 2009; Letestu *et al*, 2010).

#### — Timidina quinasa sèrica (sTK):

És un enzim relacionat amb la síntesi d'ADN que es pot detectar en les cèl·lules en divisió. És un marcador útil per a detectar l'activitat proliferativa de les cèl·lules tumorals, i s'associa a progressió i a estadis avançats de la malaltia (Konoplev *et al*, 2010; Letestu *et al*, 2010).

#### — CD23 soluble:

El CD23 és un receptor de baixa afinitat de la IgE que s'expressa fisiològicament en cèl·lules B madures, cèl·lules presentadores d'antigen i plaquetes. Els nivells de CD23 soluble elevats s'han correlacionat amb una massa tumoral més elevada, temps de duplicació limfocitària curts i amb progressió de la malaltia en estadis inicials de la LLC, així com amb una supervivència disminuïda (Saka *et al*, 2006).

### 1.3.3. Alteracions citogenètiques

Les alteracions genètiques, com en d'altres tipus de neoplàsies, tenen un paper important en la patogènesi de la LLC. Des dels anys 70, la caracterització genètica de la LLC mitjançant diverses tècniques (citogenètica convencional amb bandes G, hibridació *in situ* fluorescent (FISH), seqüenciació de Sanger, *microarrays* genòmics o tècniques de seqüenciació massiva, entre d'altres) ha estat ininterrompuda i ha permès la descripció d'un gran ventall d'alteracions genòmiques. Entre elles, les alteracions citogenètiques més freqüents són les delecions de 6q, 11q, 13q o 17p, i la trisomia del cromosoma 12, detectables fins en un 80% de pacients amb LLC quan s'utilitzen tècniques de FISH (Döhner *et al*, 2000). A més, l'impacte clínic d'aquestes anomalies ha estat àmpliament descrit i actualment es considera un dels factors pronòstics més rellevants en LLC. En funció de les alteracions citogenètiques, clàssicament s'estableixen diferents categories pronòstiques (Figura 4):

- Deleció de 13q com a única alteració: Pronòstic favorable
- Cariotip normal o trisomia 12: Pronòstic intermig
- Deleció de 17p (TP53) o 11q (ATM): Pronòstic desfavorable

Els detalls de les característiques, bases moleculars i el pronòstic d'aquestes alteracions, així com d'altres alteracions genètiques descrites a la LLC es presentaran més àmpliament a l'apartat 3 d'aquesta introducció.

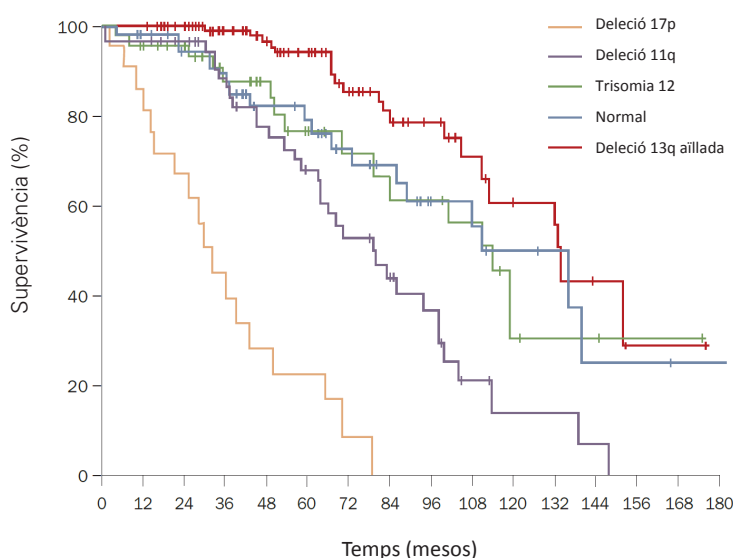


Figura 4. Supervivència global en la LLC segons les categories citogenètiques establertes per l'algorisme de Döhner i col·laboradors l'any 2000 (Döhner *et al*, 2000; imatge adaptada de Cramer *et al*, 2011)

### 1.3.4. Estat mutacional de la regió variable del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines (*IGHV*)

El procés d'hipermutació somàtica del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines (*IGHV*) té lloc quan aquells limfòcits B madurs que han entrat en contacte amb un antigen passen pels centres germinals dels òrgans limfoides secundaris. Aquest mecanisme genera una sèrie de canvis nucleotídics a *IGHV* que en modifiquen l'afinitat i l'especificitat per l'antigen (Peled *et al*, 2008). Així, juntament amb el reordenament dels diferents segments *V(D)-J* del *locus IGH*, que té lloc en les primeres etapes de la maduració del limfòcit B (Meffre *et al*, 2000), és possible la generació d'un ampli espectre de receptors de cèl·lula B (BCR, de l'anglès *B-cell receptor*) en els limfòcits B circulants de l'individu.

Des de finals dels anys 90 és sabut que almenys un 50% de pacients amb LLC són portadors de mutacions al gen *IGHV*. A més, aquesta característica no canvia durant el curs natural de la malaltia (Oscier *et al*, 1997; Fais *et al*, 1998). Pel que refereix al valor pronòstic, s'ha associat la presència de mutacions a *IGHV* (definida per una identitat de menys del 98% amb la línia germinal d'*IGHV*) amb un pronòstic més favorable dels pacients amb LLC, en termes de temps fins a progressió o temps al primer tractament i supervivència global més llargs (Damle *et al*, 1999; Hamblin *et al*, 1999). Nombrosos estudis posteriors han validat el valor pronòstic de les mutacions d'*IGHV*, amb l'excepció d'aquells pacients que presenten ús dels gens d'*IGH* de la família *IGHV3-21*, que s'associa a mal pronòstic independentment de l'estat mutacional del mateix (Tobin *et al*, 2002).

La determinació de l'estat mutacional d'*IGHV* és un procés tècnicament laboriós i presenta una interpretació complexa que requereix personal especialitzat (Ghia *et al*, 2007). Per aquest motiu, malgrat ser un marcador pronòstic independent en LLC, la seva incorporació en la pràctica clínica de rutina és força limitada.

### 1.3.5. Expressió de CD38, ZAP-70 i CD49d

Els nivells d'expressió de CD38 i ZAP-70, mesurats per citometria de flux, són els factors pronòstics que s'han proposat com a substituïts de l'estat mutacional d'*IGHV* en la pràctica clínica. D'altra banda, els panells de citometria de flux per la LLC actuals també inclouen la determinació dels nivells de CD49d com a factor pronòstic independent en LLC.

— CD38:

És una glicoproteïna de transmembrana que pot tenir funcions de receptor o d'enzim. La detecció d'una elevada expressió d'aquesta proteïna s'ha associat a altres factors pronòstics adversos, així com a mala resposta als tractaments estàndard i a supervivències lliure de progressió o global més curtes (Damle *et al*, 1999). Els pacients sense mutacions als gens *IGHV* presenten nivells elevats de CD38; no obstant, aquesta correlació no és absoluta i els nivells d'expressió de CD38 poden fluctuar durant el transcurs de la malaltia (Hamblin *et al*, 2002).

— ZAP-70:

És una proteïna que forma part del complex del receptor de cèl·lules T, i s'expressa en cèl·lules T i NK. Tot i que no s'expressa en cèl·lules B normals, les cèl·lules tumorals de la LLC poden expressar ZAP-70 a la membrana cel·lular. S'ha demostrat que el nivell d'expressió de ZAP-70 és predictor de supervivència lliure de tractament, lliure de progressió, així com supervivència global. Així, la detecció de nivells elevats de ZAP-70 s'ha associat a un pronòstic desfavorable (Rassenti *et al*, 2004). La concordança entre l'expressió de ZAP-70 i l'estat mutacional de les *IGHV* s'estableix entre el 77-95%, a més, els nivells de ZAP-70 es mantenen estables en la LLC (Orchard *et al*, 2004).

— CD49d:

És una integrina de membrana que s'expressa de forma variable a les cèl·lules B de la LLC. S'ha descrit que la seva expressió facilita la interacció de les cèl·lules leucèmiques amb el microambient i en promou la proliferació, així mateix, identifica un subgrup de pacients caracteritzats per presentar un curs clínic progressiu i una supervivència global curta (Gattei *et al*, 2008). Recentment, en un estudi multicèntric de 3000 pacients, s'ha demostrat que una expressió elevada de CD49d (major al 30%) és un factor pronòstic independent que s'associa a una menor supervivència lliure de tractament i una supervivència global. És destacable que l'expressió de CD49d és el factor pronòstic definit per citometria de flux més potent en LLC, amb un poder predictiu superior a CD38 i ZAP-70 (Bulian *et al*, 2014).

La Taula 3 mostra un resum dels paràmetres amb pronòstic utilitzats actualment en el maneig de la LLC:

Factor pronòstic	Baix risc	Altrisc
Estadiclínic	Binet A / Rai 0, I	Binet B, C / Rai II, III, IV
Marcadors sèrics (B2M, LDH, sTK, CD23 soluble)	Nivells normals	Nivells sèrics incrementats
Alteracions citogenètiques	Normal, del(13q)	del(11q), del(17p)
Estat mutacional <i>IGHV</i>	Mutat	No mutat
Ús família <i>IGVH3-21</i>	No	Sí (independentment de l'estat mutacional)
Expressió CD38	Baixa	Elevada
Expressió ZAP-70	Baixa	Elevada
Expressió de CD49d	Baixa	Elevada
Mutació <i>TP53</i>	No mutat	Mutat

Taula 3. Taula resum dels principals factors pronòstics en la LLC

## 1.4. Tractament de la LLC

### 1.4.1. Criteris de tractament

La LLC pot presentar un curs clínic molt variable: en pacients asimptomàtics i en estadis inicials es recomana seguiment sense teràpia (estratègia *watch & wait*), sempre i quan el pacient no presenti signes evidents de progressió. No s'ha demostrat que el tractament precoç de la LLC, previ a la progressió de la malaltia, tingui un impacte evident en la supervivència dels pacients. Així doncs, l'inici de tractament està indicat en aquells pacients que presenten almenys un dels següents criteris de malaltia progressiva (Hallek *et al*, 2008):

1. Limfocitosi progressiva, amb un increment limfocitari de més del 50% en dos mesos o un temps de duplicació limfocitària menor a sis mesos
2. Adenopaties de més de 10 cm o progressives
3. Insuficiència medul·lar progressiva, que es manifesta per aparició o increment d'anèmia i/o trombocitopènia

4. Esplenomegàlia de més de 6 cm o progressiva
5. Citopènies autoimmunes amb escàs/nul control amb teràpia de corticoides
6. Presència de símptomes constitucionals (pèrdua de pes, fatiga, febre, etc.)

És destacable que alguns pacients amb LLC poden presentar xifres absolutes de limfòcits molt elevades. No obstant, aquestes no s'associen necessàriament a simptomatologia o progressió, de manera que la xifra limfocitària per si sola no és indicativa de tractament en LLC.

#### 1.4.2. Estratègies terapèutiques actuals en LLC

En les últimes dècades hi ha hagut un gran progrés en el tractament de la LLC. No obstant, malgrat la millora en les taxes de resposta i la supervivència lliure de progressió assolides, la LLC encara es considera una malaltia incurable. Actualment hi ha diferents opcions terapèutiques que s'adapten a l'estadi clínic, l'activitat de la malaltia, l'edat i les comorbiditats presents en cada pacient (Smolewski *et al*, 2013).

Durant molts anys el tractament de la LLC es va basar en la utilització d'agents alquilants com el clorambucil o la ciclofosfamida (Dighiero *et al*, 1998). La introducció posterior dels anàlegs de les purines (com per exemple la fluradabina, la cladribina o la pentostatina), de forma aïllada o en combinació, va permetre millorar les taxes de resposta, la supervivència lliure de progressió i la taxa remissions complertes assolides en els pacients amb LLC (Rai *et al*, 2000; Eichhorst *et al*, 2009). El desenvolupament d'anticossos monoclonals, com l'anti-CD20 rituximab, ha suposat una revolució en el tractament de les neoplàsies hematològiques de cèl·lula B. Així, els tractaments d'immunoquimioteràpia que combinen fludarabina i cladribina (agents quimioteràpics convencionals) amb l'anticòs monoclonal rituximab (R-FC) han demostrat millorar les taxes de resposta i, per primer cop, millorar la supervivència global en LLC (Hallek *et al*, 2010). El règim R-FC ha esdevingut el tractament d'elecció en primera línia de la LLC, mentre que l'ús d'agents alquilants en monoteràpia, com el clorambucil, segueix essent utilitzat per pacients fràgils d'edat avançada o amb comorbiditats. Malgrat la millora aconseguida amb la immunoquimioteràpia, la proporció de pacients que presenten recaigudes o que són refractaris als tractaments convencionals és encara destacable. Durant els últims anys, han sorgit una gran varietat de nous fàrmacs que tenen una acció dirigida a vies cel·lulars essencials en la patogènesi del limfòcit B tumoral, com la via del BCR o Bcl-2 (Figura 5), o tenen un efecte immunomodulador en el microambient

de la cèl·lula tumoral (Hallek *et al*, 2013). Els resultats obtinguts en assajos clínics amb aquests tractaments són esperançadors, i s'obtenen unes taxes de resposta superiors als tractaments convencionals, inclús en els pacients amb pèrdua de *TP53*, típicament associats a refractarietat i resistència al tractament. Aquest fet ha conduït recentment a l'aprovació de nous fàrmacs dirigits contra la via del BCR en pacients amb LLC i pèrdua de *TP53* o refractaris a altres tractaments: l'inhibidor de BTK, anomenat ibrutinib (Byrd *et al*, 2014) i l'inhibidor de PI3K, anomenat idelalisib (Furman *et al*, 2014).

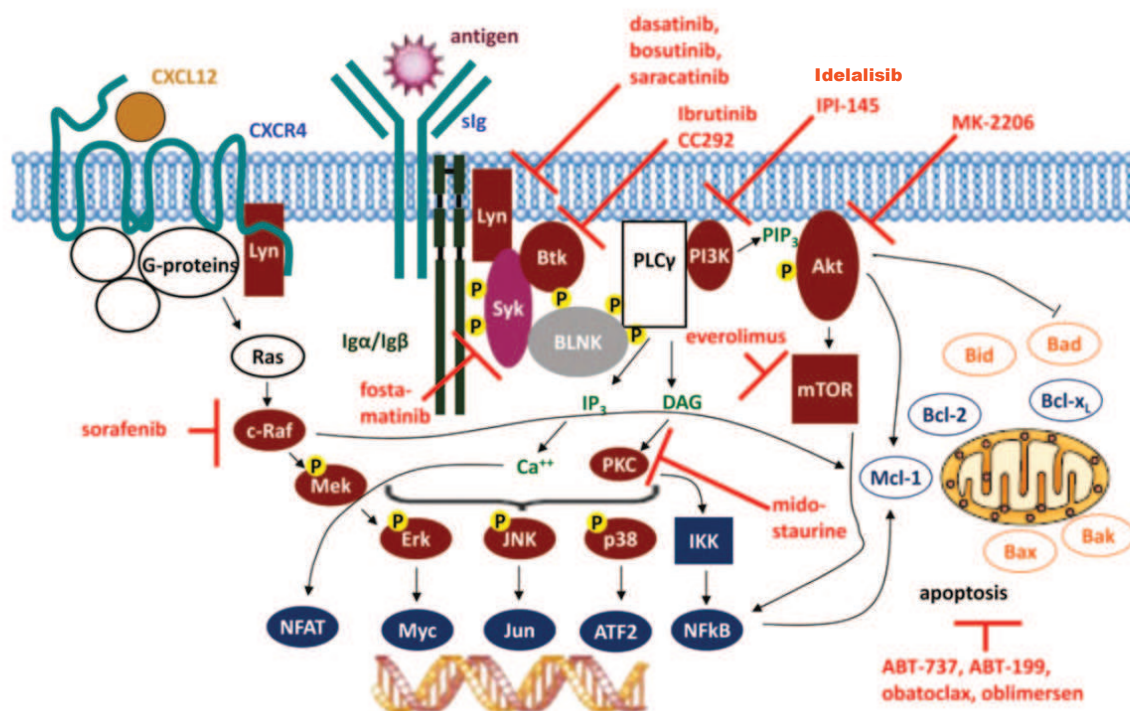


Figura 5. Esquema dels nous tractaments desenvolupats en LLC dirigits a dianes de la via del BCR (Hallek *et al*, 2013). Els fàrmacs que actuen sobre cada diana concreta es mostren en color vermell.



## 2. Tècniques d'anàlisi genètica aplicades a la LLC

### 2.1. Citogenètica convencional (CC)

L'aplicació de la citogenètica convencional (CC) permet obtenir una informació global del genoma mitjançant l'estudi dels cromosomes. Un cromosoma és l'estructura de màxima compactació de la cromatina, formada per ADN i proteïnes, que es forma durant la fase de mitosi o divisió cel·lular. És per aquest motiu que, per a l'estudi de citogenètica, cal realitzar un cultiu cel·lular per obtenir cromosomes en metafase. En el cas de les neoplàsies de cèl·lula B, s'addiciona un mitogen als cultius que estimula la divisió de la cèl·lula tumoral: el TPA (12-tetradecanoilforbol-13-acetat) és el mitogen més utilitzat en aquestes patologies. No obstant, davant la taxa limitada de mitosis dels limfòcits B aconseguida en mostres de pacients amb LLC utilitzant els mètodes convencionals, s'han desenvolupat protocols amb altres mitògens, com el lligand de CD40 o la combinació de nucleòtids CpG i interleucina 2, que han permès incrementar la taxa de detecció d'alteracions cromosòmiques en aquests pacients (Dicker *et al*, 2006; Haferlach *et al*, 2007; Put *et al*, 2009a; Heerema *et al*, 2010).

Al llarg del temps s'han desenvolupat diferents tècniques de tinció que permeten obtenir un perfil de bandes específic per a identificar cada cromosoma. El més utilitzat és el patró de bandes G (del colorant Giemsa). El colorant utilitzat té una afinitat diferent per les regions cromosòmiques en funció de la proporció d'Adenina (A) - Timina (T) i Citosina (C) - Guanina (G) que presenten. Així, s'obtenen bandes d'entre 5 i 10 Mb que poden ser clares, en regions amb alt contingut en G-C que són zones de replicació primerenca i riques en gens, o bé fosques, si presenten un alt contingut en A-T. D'aquesta manera és possible la definició del cariotip, on s'identifiquen els 22 parells de cromosomes autosòmics i els cromosomes sexuals (X i Y) en funció de la mida, el patró de bandes i la forma dels cromosomes. En funció de la posició que ocupa el centròmer en el cromosoma, i de la mida que presenten el braç curt "p" i llarg "q" del mateix, es defineixen diferents tipus de cromosomes:

— Cromosomes metacèntrics:

El centròmer separa dos braços de la mateixa mida

— Cromosomes submetacèntrics:

El centròmer separa dos braços de diferent grandària, dels quals el braç "p" sempre és més petit que el "q"

— Cromosomes acrocèntrics:

El centròmer es troba en un extrem, el braç "p" és molt curt, de vegades quasi imperceptible.

La nomenclatura utilitzada per descriure un cariotip, ja sigui normal o alterat, és un sistema estandarditzat i acceptat internacionalment que s'anomena ISCN (*International System for Human Cytogenetics Nomenclature*). Aquesta nomenclatura es va actualitzant i revisant periòdicament. Les versions de l'ISCN utilitzades pels treballs inclosos en aquesta tesi són la del 2009 (Shaffer *et al*, 2009), pels treballs 1 i 3, i l'última edició corresponent a l'any 2013 (Shaffer *et al*, 2013), pel segon treball.

## 2.2. Hibridació *in situ* fluorescent (FISH)

La tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH, de l'anglès *fluorescence in situ hybridization*) permet detectar i localitzar seqüències específiques d'àcids nucleics (ADN o ARN) sobre preparacions cromosòmiques, extensions cel·lulars i talls de teixit (Pardue i Gall, 1969; Jones, 1970; Harper i Saunders, 1981). La tècnica de FISH consisteix en hibridar petites seqüències d'ADN de cadena senzilla, anomenades sondes, amb la seqüència complementària de la mostra a estudiar. Les sondes utilitzades han estat marcades prèviament amb molècules fluorescentes (ex. FITC o Rodamina), ja sigui de forma directa o indirecta. Així, l'anàlisi final de la hibridació amb la mostra d'interès es realitza al microscopi de fluorescència.

La tècnica de FISH es va desenvolupar a finals dels anys 80 i va suposar una revolució tant en l'estudi citogenètic constitucional com en l'estudi de les alteracions adquirides en neoplàsies hematològiques i tumors sòlids. El fet de poder treballar sobre seccions de teixit o nuclis en interfase, així com la major sensibilitat i resolució que ofereix en front de l'estudi del cariotip, ha permès que el FISH s'hagi incorporat als laboratoris de rutina com a tècnica complementària a la tècnica de citogenètica convencional.

La base metodològica de la FISH recau en l'habilitat de desnaturalització i renaturalització de l'ADN. Les principals etapes de la tècnica de FISH es detallen a la Figura 6 i són les següents:

### — Preparació de la mostra:

La mostra a estudiar pot ser una extensió de material procedent del cultiu de citogenètica convencional (per a l'estudi de metafases o nuclis en interfase) o pot procedir de material fixat directament de líquids biològics, així com talls de teixit en parafina, prèviament tractats per a la correcta hibridació de la sonda.

### — Marcatge de la sonda:

La sonda a utilitzar ha de ser complementària a la regió d'interès que es vol estu-

diar i s'ha de marcar de forma directa (marcatge amb nucleòtids units a fluorocrom) o indirecta (marcatge amb nucleòtids modificats que contenen un haptè, generalment biotina o digoxigenina, sobre les quals s'afegeix la fluorescència mitjançant una reacció immunofluorescent). Actualment la majoria de sondes que s'utilitzen són sondes comercials que ja porten el marcatge incorporat, tot i que també es poden utilitzar sondes no comercials que es marquen per mètodes enzimàtics com la *nick translation*. Aquest mètode enzimàtic es basa en el tall de l'ADN en fragments de 500 pb mitjançant una exonucleasa i la incorporació posterior de nucleòtids marcats amb fluorocrom per part d'una ADN polimerasa (Rigby *et al*, 1977).

— Desnaturalització:

Consisteix en el trencament dels ponts d'hidrogen que uneixen la doble hèlix de l'ADN, tant de la mostra com de la sonda, sotmetent-les a temperatures elevades (70-80°C).

— Hibridació:

en incubar conjuntament la sonda i la mostra a una temperatura de 37°C durant unes 16-48 hores per permetre l'anellament per complementarietat de bases.

— Rentats posthibridació:

Consisteix en fer rentats amb solucions salines a temperatura elevada o solucions de formamida per tal d'eliminar l'excés de sonda no unida a l'ADN diana.

— Contratinció:

Consisteix en incubar la mostra amb un fluorocrom que s'intercali en la doble cadena d'ADN genòmic de forma inespecífica i permeti la visualització dels nuclis o metafases al microscopi de fluorescència. El DAPI II és el fluorocrom més utilitzat en aquesta etapa de la tècnica de FISH.

— Visualització:

Per a l'anàlisi del FISH és necessari un microscopi de fluorescència, amb una làmpada de mercuri que emet una radiació amb una longitud d'ona que excita els fluorocroms hibridats amb l'ADN de la mostra.

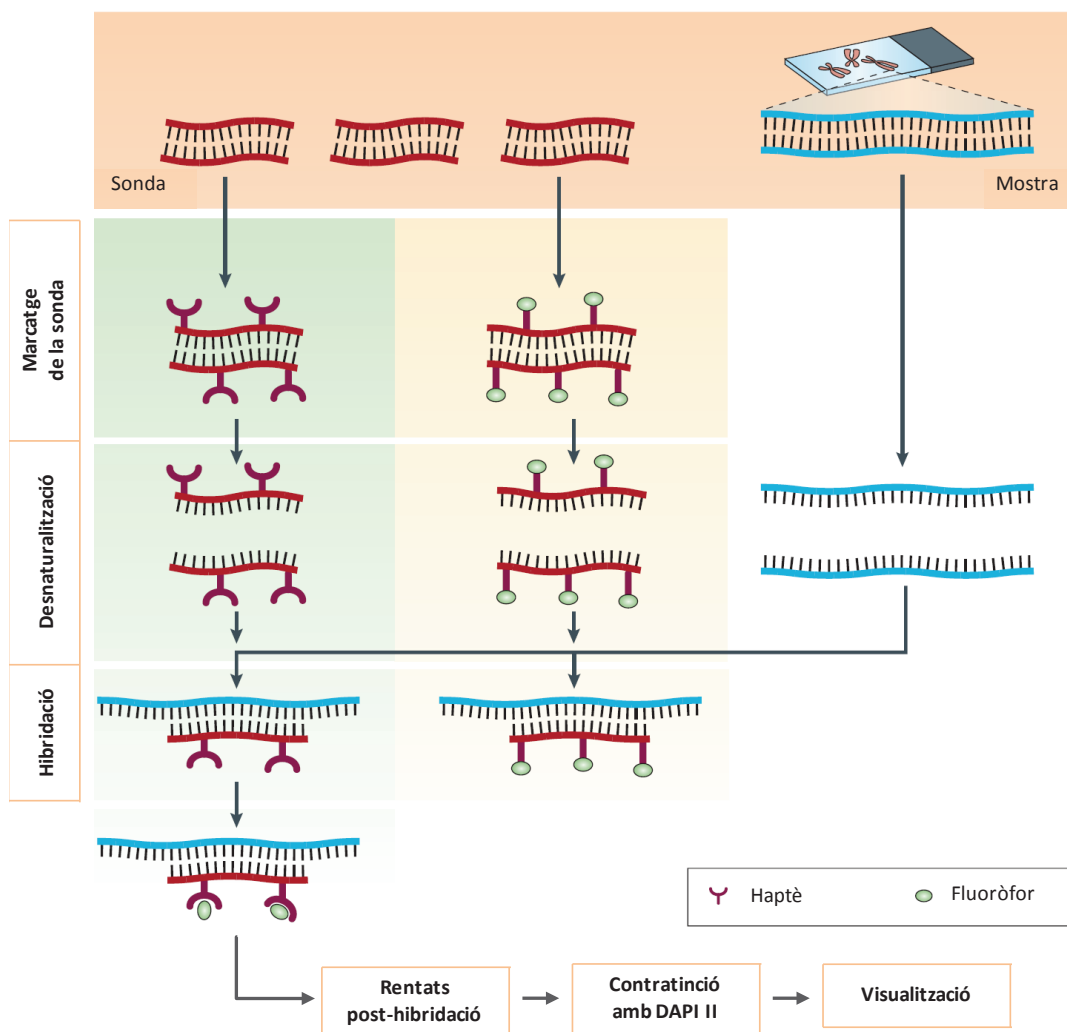


Figura 6. Etapes de la tècnica de FISH (Adaptat de Speicher i Carter, 2005)

### 2.2.1. Tipus de sondes

L'estudi de FISH permet una anàlisi citogenètica focalitzada a la regió cromosòmica complementària a la sonda aplicada, per aquest motiu és molt important l'elecció d'un disseny de sonda adequat per a l'alteració que es vol identificar. Els diferents tipus de sondes de FISH es mostren representats a la Figura 7 i es detallen a continuació:

#### — Sondes centromèriques:

Sondes que reconeixen específicament les seqüències repetitives de l'ADN de la regió centromèrica de cada cromosoma. Permeten detectar alteracions cromosòmiques numèriques (aneuploïdies).

— Sondes de pintat cromosòmic:

Consisteixen en un còctel de sondes de seqüència única que cobreixen de forma específica un cromosoma sencer. S'utilitzen per identificar alteracions estructurals o cromosomes marcadors no ben definits per CC. Per a la seva interpretació és necessari fer l'anàlisi de la hibridació sobre metafases.

— Sondes de seqüència única (*locus* específic):

Són aquelles sondes que marquen gens o regions cromosòmiques concretes. Permeten la detecció d'alteracions en el nombre de còpies del *locus* estudiat, així com la detecció de reordenaments cromosòmics que afectin al mateix.

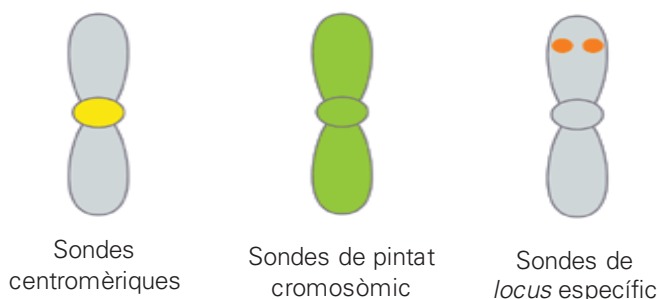


Figura 7. Principals sondes de FISH (Adaptat deadaptat de McNeil i Ried, 2000)

Per a la detecció de reordenaments cromosòmics el disseny de la sonda inclou dos fragments marcats amb fluorocroms diferents que canvien la seva posició relativa en presència de l'alteració. En aquest tipus de sondes trobem dos tipus de dissenys (Figura 8):

— Sondes de doble fusió: els dos gens implicats en la translocació que es vol identificar es marquen amb fluorocroms diferents, de manera que la detecció de dos senyals de fusió permet identificar la translocació. A més, també permeten identificar patrons de FISH variants (ex. deleció associada a la translocació).

— Sondes de trencament o break-apart: s'utilitzen per a la detecció de reordenaments d'un únic *locus* i són especialment útils en el cas d'oncogens amb múltiples parelles de translocació. En aquest cas s'hibriden amb fluorocroms diferents els extrems 3' i 5' de l'oncogen a estudiar, de manera que la separació de les senyals de fusió és indicativa de reordenament de l'oncogen estudiat.

Actualment, hi ha un ampli ventall de sondes comercials disponibles per a l'estudi de FISH. No obstant, en cas de voler estudiar una regió genòmica concreta per la qual no existeixi sonda comercial, es pot dur a terme el disseny d'una sonda no comercial.

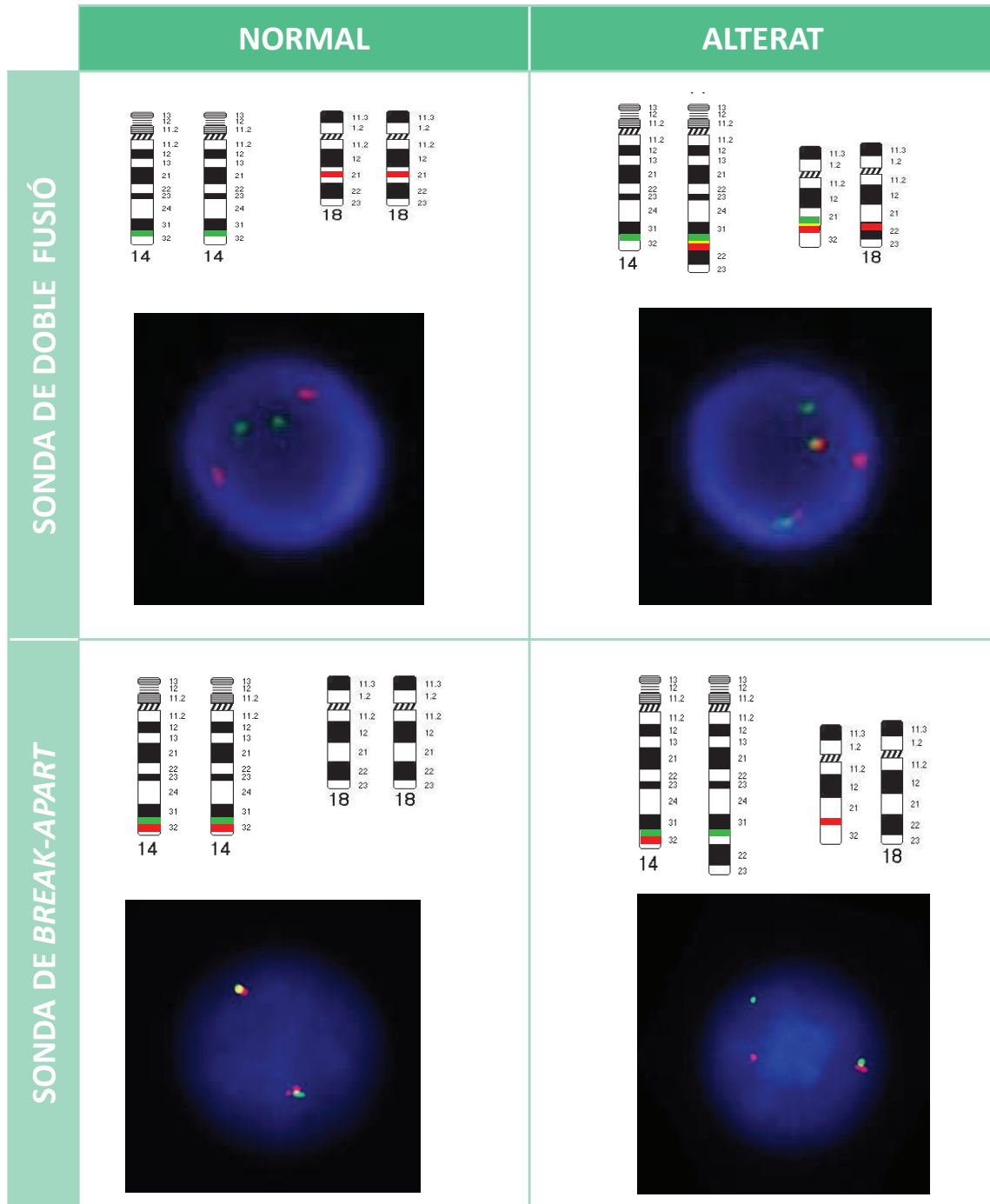


Figura 8. Tipus de sondes de *locus* específic per a la detecció de reordenaments cromosòmics. Per a cada tipus de disseny, sonda de doble fusió o sonda de *break-apart*, es mostra el patró de FISH normal i el patró de FISH típic de translocació.

### 2.2.2. Sondes no comercials

Les sondes no comercials es poden fabricar a partir de seqüències d'ADN complementari (Von Deimling *et al*, 1999), plàsmids (Tsuchiya *et al*, 2002), còsmids (Tsuchiya *et al*, 2002), clons P1 (Mark *et al*, 2005), fòsmids (Birren *et al*, 1996), YACs (de l'anglès *yeast artificial chromosome*) (Liehr *et al*, 2002) o BACs (de l'anglès *bacterial artificial chromosome*) (Liehr *et al*, 2002). L'elecció d'un vector o un altre es realitza en funció de la longitud de l'ADN que es vol clonar; no obstant, el vector més utilitzat a l'actualitat són els BACs.

Els BACs són F-plàsmids que contenen insertada una seqüència del genoma humà a clonar, d'aproximadament 300 Kb, i un gen de resistència a antibiòtic. Els BACs són transfectats a bacteris *Escherichia coli*, que es cultivaran en medi LB (Luria-Bertoni) en presència d'antibiòtic per a seleccionar aquells que contenen el BAC. Després, els bacteris són lisats i es procedeix a l'aïllament de la seqüència d'ADN clonada i al seu marcatge mitjançant el protocol de *Nick Translation* (Rigby *et al*, 1977). Un cop s'ha marcada la sonda del BAC, és important descartar cohibridació amb altres regions del genoma, hibridant-la sobre metafases procedents de cultius de citogenètica d'individus sans.

### 2.3. Microarrays genòmics

Un *microarray* es defineix com una col·lecció d'elements ordenats ortogonalment en files i columnes sobre d'un suport sòlid petit (miniaturitzat: "micro"). En funció del bioelement present al suport es poden distingir diferents tipus de *microarrays*, entre els quals destaquen els genòmics (ADN), d'expressió (ADN còpia), de teixit (cilindres de teixit parafinat), de cèl·lules o de proteïnes.

Els *microarrays* genòmics permeten detectar alteracions en el número de còpies de l'ADN o realitzar l'estudi del genotip en funció dels canvis en un únic nucleòtid (*SNPs*, de l'anglès *single nucleotide polymorphism*). Segons el sistema d'hibridació utilitzat, se'n poden distingir dos tipus: *microarrays* d'hibridació genòmica comparada (HGC) o *microarrays* de *SNPs* (Figura 9).

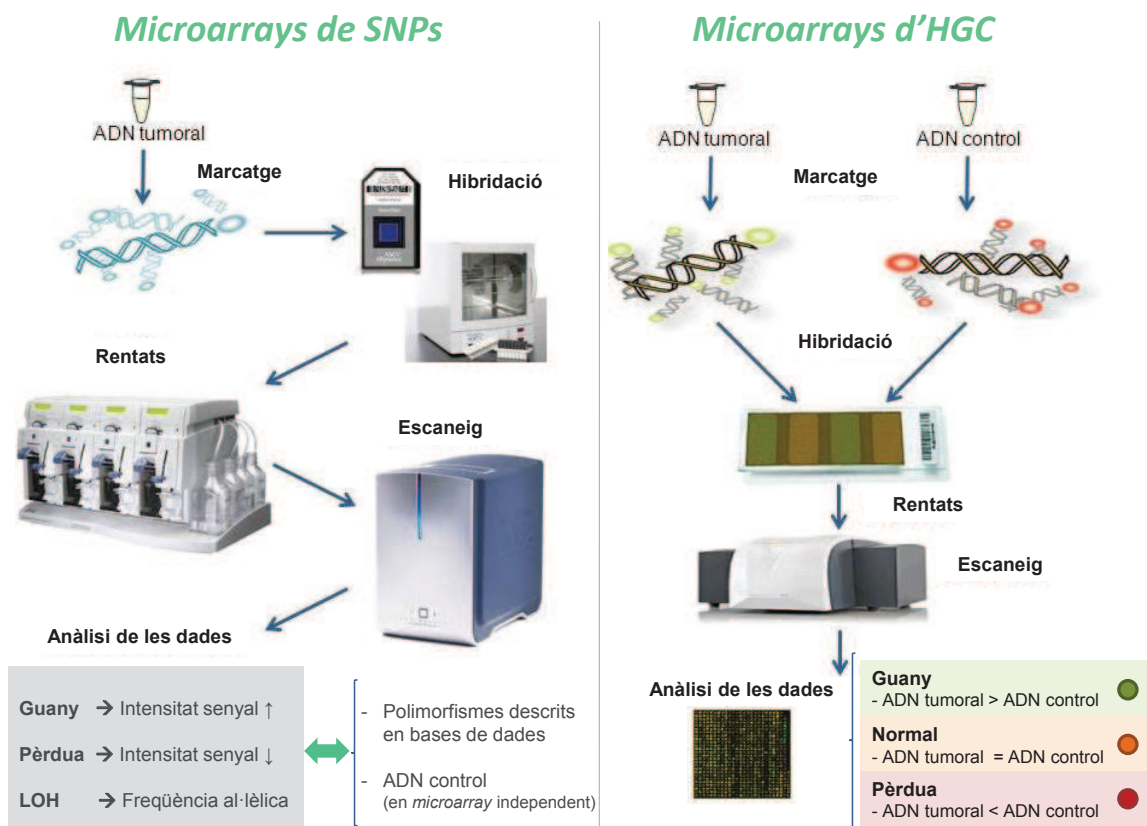


Figura 9. Esquema del procés bàsic dels *microarrays* d'HGC i dels *microarrays* de SNPs

Els **microarrays d'HGC** van sorgir com a evolució de la tècnica d'HGC desenvolupada a principis dels anys 90 (Kallioniemi *et al*, 1992). El seu principi es basa en la hibridació competitiva d'un ADN tumoral contra un ADN normal, cadascun d'ells marcat amb fluorocroms diferents. En l'HGC la hibridació es realitza sobre metafases i permet obtenir una resolució de només 5-10 Mb. Per contra, a final dels anys 90 es va descriure la tècnica de *microarrays* d'HGC, en la qual la hibridació es realitza sobre un suport sòlid amb milers o milions de sondes que cobreixen tot el genoma, o una regió concreta, i permet assolir nivells de resolució superiors (Solinas-Toldo *et al*, 1997; Pinkel *et al*, 1998). La resolució concreta de cada *microarray* depèn del tipus de sondes que utilitza: BACs (entre 200 i 300Kb) o oligonucleòtids (fins a 50-80 pb).

Els **microarrays de SNPs**, descrits l'any 2000 (Mei *et al*, 2000), estan formats per un conjunt de sondes d'oligonucleòtids que, a més, contenen variants de SNPs. A diferència dels *microarrays* d'HGC, la hibridació no és competitiva, sinó que la mostra tumoral s'hibrida sobre el *microarray* i posteriorment es compara el resultat



de la hibridació amb bases de dades de població normal o amb mostra control del mateix individu, que s'ha hibridat en un *microarray* independent. La principal avantatge dels *microarrays* de *SNPs* és que, a més de la detecció de guanys i pèrdues a l'ADN, la informació dels *SNPs* permet conèixer l'origen parental de cada còpia cromosòmica. D'aquesta manera es poden identificar alteracions al·lèliques que no impliquen canvi en el número de còpies com les disomies uniparentals adquirides (DUPa), on les dues còpies d'una determinada regió cromosòmica provenen del mateix progenitor. La conseqüència patogènica de les DUPa consisteix en una pèrdua d'heterozigositat de la regió (LOH, de l'anglès *loss of heterozigosity*), en la qual les possibles mutacions presents en aquesta regió deixen d'estar contrarestades per l'al·lel sa, i adquireixen un estat homozigot que pot afavorir el desenvolupament tumoral (Makishima *et al*, 2011).

A la Taula 4 es mostra una comparativa de les avantatges i limitacions que ofereixen les diferents tècniques de detecció d'alteracions citogenètiques utilitzades en aquesta tesi:

Tècnica	Ressolució	Sensibilitat	Necessitat d'obtenir cèl·lules en divisió	Distinció entre clons individuals	Visió global del genoma	Detecció d'alteracions equilibrades	Detecció de LOH
Citogenètica convencional	Baixa	10%	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Hibridació <i>in situ</i> fluorescent	Baixa	Alta	No	No	No	Sí	No
<i>Microarrays</i> genòmics de <i>SNPs</i>	Alta	20-30%	No	No	Sí	No	Sí
<i>Microarrays</i> genòmics d'HGC	Alta	20-30%	No	No	Sí	No	No

Taula 4. Comparació de les tècniques d'anàlisi citogenètica (Adaptat de Maciejewski *et al*, 2009).

## 2.4. Seqüenciació directa de Sanger

A la dècada dels 70, Frederick Sanger va desenvolupar un mètode de seqüenciació de l'ADN, actualment conegut com mètode Sanger o de seqüenciació directa (Sanger *et al*, 1975; Sanger *et al*, 1977). Aquest es basa en la utilització de didesoxinucleòtids trifosfats (ddNTPs), nucleòtids sense el grup hidroxil (-OH) a l'extrem 3', per a la síntesi d'ADN. Els grups hidroxils de la posició 3' són imprescindibles per a l'elongació de la cadena d'ADN, ja que és on les ADN polimerases estableixen els enllaços fosfodièster per agregar el següent nucleòtid. Així, la incorporació d'un ddNTP a la cadena d'ADN atura el procés de síntesi de la mateixa. En el mètode de Sanger, l'ADN es sintetitza *in vitro* fent servir un motlle de la cadena d'ADN que es vol seqüenciar, ddNTPs, un excés de desoxinucleòtids (dNTPs), un encebador o *primer* i una ADN polimerasa. D'aquesta manera, els ddNTPs s'incorporaran a l'atzar i es generaran un conjunt de seqüències de diferent longitud. Posteriorment, es procedeix a l'anàlisi de seqüències mitjançant un gel d'electroforesi on els fragments d'ADN ordenats per mida permeten establir la seqüència en funció de l'última base nucleotídica addicionada a la cadena.

Una de les variacions de la tècnica Sanger és afegir ddNTP marcats amb molècules fluorescentes. Cadascun dels quatre ddNTPs es marca amb un fluorocrom que emet a una longitud d'ona diferent. El resultat de la reacció de seqüenciació s'analiza amb un seqüenciador, un sistema d'electroforesi capil·lar d'alta resolució unit a un sistema de fluorescència. La Figura 10 mostra un esquema del procés.

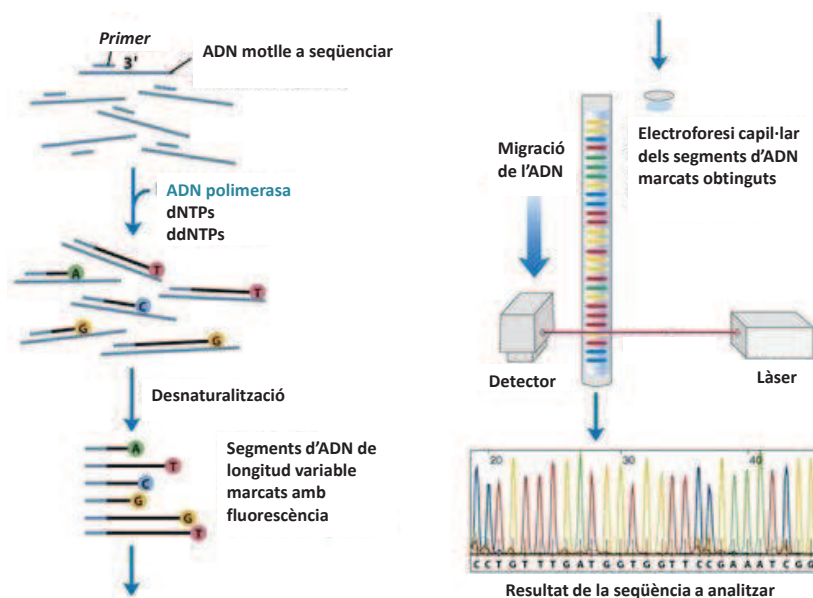


Figura 10. Esquema del procés de seqüenciació automàtica de l'ADN (Adaptat de Nelson i Cox, 2006)

## 3. Alteracions genètiques de la LLC

### 3.1. Alteracions recurrents amb valor pronòstic conegut en la LLC

#### 3.1.1. Deleció 13q14

La deleció de la regió 13q14 [del(13q)] és l'alteració citogenètica detectada amb més freqüència per FISH en la LLC, es troba en més del 50% de pacients i històricament s'ha associat a bon pronòstic (Döhner *et al*, 2000). Durant els últims anys, diversos estudis han descrit alguns gens localitzats a 13q que poden estar relacionats amb la patogènesi de la LLC i també han posat de manifest l'heterogeneïtat en el pronòstic dels pacients amb aquesta alteració.

Pel que es refereix a la base biològica de les delecions de 13q, s'ha descrit que els micro ARNs (miARNs) miR-15a i miR16-1, localitzats a la regió mínima delecionada, exerceixen una funció supressora tumoral en LLC (Calin *et al*, 2002; Klein *et al*, 2010). No obstant, les pèrdues a 13q14 no inclouen els miR-15a i miR16-1 de forma invariable i, malgrat molts pacients amb LLC en presenten una expressió disminuïda, no s'ha establert una correlació clara entre el número d'al·lels de 13q delecionats i el nivell d'expressió de miR-15a i miR16-1 (Ouillette *et al*, 2008). Així doncs, a part d'aquests miARNs, altres gens localitzats a 13q, com *DLEU7*, podrien cooperar en l'activitat supressora tumoral. A més, s'ha descrit que aquelles delecions de 13q de mida gran que engloben el gen retinoblastoma (*RB1*) (delecions de tipus II) s'associen a un temps fins al primer tractament i una supervivència global més curts que aquelles pèrdues petites que afecten únicament miR-15a i miR16-1 (delecions de tipus I) (Figura 11) (Ouillette *et al*, 2008; Mosca *et al*, 2010; Ouillette *et al*, 2011a; Parker *et al*, 2011).

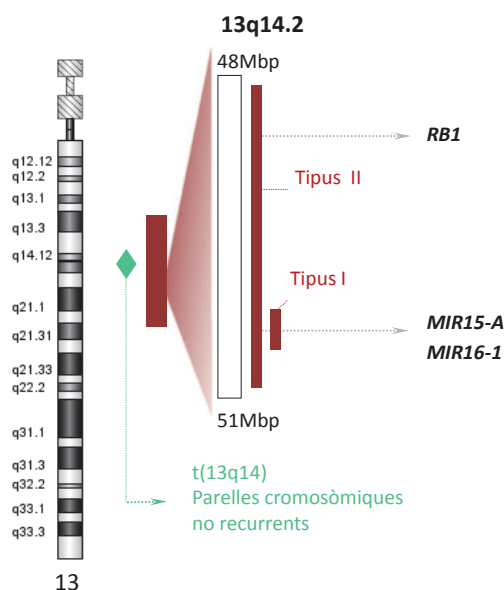


Figura 11. Esquema de les alteracions de 13q14 recurrents en LLC. En vermell es marquen les delecions, en verd les translocacions cromosòmiques.

Contràriament al que passa en altres alteracions de la LLC, la pèrdua bial·lèlica de 13q s'ha descrit en aproximadament un 30% de pacients amb deleció 13q (Reddy *et al*, 2006). Les delecions bial·lèliques són típicament de mida petita i no afecten RB1 (Ouillet *et al*, 2008), però l'impacte clínic de la pèrdua del segon al·lel és motiu de controvèrsia a la literatura. Mentre que alguns autors han postulat que sorgeixen d'una evolució de les delecions monoal·lèliques i, per tant, representen una alteració més agressiva (Dewald *et al*, 2003; Chena *et al*, 2008; Dal bo *et al*, 2011; Orlandi *et al*, 2013), d'altres no han trobat diferències significatives en les característiques al diagnòstic i l'evolució clínic dels pacients amb deleció 13q monoal·lèlica i bial·lèlica (Van Dyke *et al*, 2010; Garg *et al*, 2012). Cal tenir en compte que la regió 13q14 també pot ser inactivada per altres mecanismes que no impliquen alteració en el número de còpies, com la pèrdua d'heterozigositat (Malek, 2013), o mecanismes epigenètics com la metilació d'illes CpG de l'ADN (Mertens *et al*, 2006) o la desacetilació d'histones (Sampath *et al*, 2012). En aquest sentit, és factible assumir que l'efecte potencial que podria causar la pèrdua bial·lèlica de 13q en el pronòstic pugui estar emmascarat, ja sigui per les diferències en la mida de la deleció o per la inactivació de l'al·lel restant per altres mecanismes.

D'altra banda, s'ha descrit que el pronòstic dels pacients amb deleció de 13q aïllada també es pot estratificar segons la mida del clon alterat per FISH. S'ha descrit que els casos que presenten percentatges alts de nuclis alterats s'associen de forma significativa a temps fins al primer tractament i supervivència global més curts (Hernández *et al*, 2009; Van Dyke *et al*, 2010; Dal bo *et al*, 2011; Orlandi *et al*, 2013). De fet, tot i que el punt de tall suggerit oscil·la entre el 65,5% i el 90% de nuclis, s'ha demostrat que el percentatge de deleció 13q detectada per FISH manté el valor predictiu si es considera com a variable contínua (Van Dyke *et al*, 2010; Orlandi *et al*, 2013).

A més d'una evolució clínic variable, els perfils d'expressió gènica i de miARNs obtinguts en pacients amb deleció de 13q posen de manifest l'heterogeneïtat biològica en aquest subgrup (Mosca *et al*, 2010; Rodríguez *et al*, 2012a). S'han descrit perfils transcripcionals específics per a dos subgrups de deleció 13q basats en la mida de la mateixa (gran/monoal·lèlica vs. petita/bial·lèlica). Així, aquells pacients amb pèrdues grans de 13q mostraven disminució de l'expressió de deu gens que incloïen *TPT1/TCTP*, relacionat amb la supervivència i creixement per inhibició de l'apoptosi induïda per *BAX*, i sobreexpressió de 53 gens. La majoria de gens sobreexpressats (*GPI*, *BSG*, *LGALS1*, *PAK2*, *PARVB* i *VIM*, entre altres) intervenien en funcions de motilitat i adhesió, regulació de la proliferació cel·lular, migració de la cèl·lula tumoral, metastasi, angiogènesi i apoptosi. D'altra banda, els pacients amb percentatges alts de del(13q) per FISH (més del 80%) també presenten una desregulació rellevant de l'expressió gènica. Aquesta inclou alguns miARNs impor-

tants, així com la sobreexpressió de gens relacionats amb la senyalització del BCR (ex. *SYK* i *CD79b*), la senyalització NFκB, o vies antiapoptòtiques i de supervivència (ex. senyalització de Wnt i RAS). És destacable que el patró descrit pels pacients amb més del 80% de del(13q) era molt similar al que presentaven els pacients amb deleció de 11q o 17p inclosos en el mateix estudi (Rodríguez *et al*, 2012a).

Globalment, malgrat l'heterogeneïtat demostrada en la del(13q), els estudis més recents que integren dades moleculars i citogenètiques segueixen considerant els pacients amb deleció de 13q aïllada dins de la categoria de risc molt baix (Rossi *et al*, 2013; Jeromin *et al*, 2014). L'estudi de Jeromin i col·laboradors també ha descrit associació de la del(13q) amb la mutació del gen *MYD88*, però aquesta no provoca cap efecte aparent en el pronòstic (Jeromin *et al*, 2014).

### 3.1.2. Trisomia 12

La trisomia del cromosoma 12 s'observa en un 10-20% de pacients amb LLC i representa la tercera alteració més freqüentment detectada per FISH en aquesta entitat. En la majoria de pacients es presenta com a única anomalia cromosòmica (40-60% dels casos amb trisomia), tot i que també s'ha associat a altres alteracions, com són les trisomies 18 i 19, delecions recurrents típiques de la LLC (ex. 13q, 11q, 14q o 17p) i translocacions del gen *IGH* (Döhner *et al*, 2000; Roos-Weil *et al*, 2013).

La trisomia 12 és considerada com a marcador de risc intermedi en l'algorisme proposat per Döhner i col·laboradors. No obstant, hi ha hagut molta controvèrsia sobre el valor pronòstic associat a aquesta alteració (Döhner *et al*, 2000). Mentre les primeres publicacions correlacionaven la trisomia 12 amb un curs clínic més agressiu (Oscier *et al*, 1990; Matutes *et al*, 1996), els estudis posteriors tendeixen a considerar-la en la categoria de risc intermedi o, fins i tot, de risc baix (Gunnarsson *et al*, 2011; Rossi *et al*, 2013). De fet, els pacients amb LLC i trisomia 12 representen un grup heterogeni amb una taxa de supervivència molt variable. Aquesta heterogeneïtat entre pacients pot atribuir-se, en part, a l'associació de la trisomia 12 amb altres característiques de la malaltia que comporten un impacte negatiu en el pronòstic, com l'expressió de CD38, CD49d o la presència de mutacions al gen *NOTCH1*. Recentment s'ha descrit l'associació entre les mutacions de *NOTCH1* i la trisomia 12, especialment en aquells pacients amb altres marcadors de mal pronòstic (*IGHV* no mutades i/o positivitat per a ZAP-70) (Gattei *et al*, 2008; Quijano *et al*, 2008; Balatti *et al*, 2012; Villamor *et al*, 2013). També s'ha relacionat la presència de trisomia 12 amb una morfologia i immunofenotip atípics de LLC (Woessner *et al*, 1996; Athanasiadou *et al*, 2006; Quijano *et al*, 2008), així com amb

una alta freqüència d'absència de mutacions a *IGHV*, i de l'ús de les famílies *IGHV1* i *IGHV4-39* (Athanasidou *et al*, 2006; López *et al*, 2012a; Falisi *et al*, 2014).

Actualment es considera que la trisomia 12 és una alteració primerenca en el transcurs de la LLC, que facilita l'aparició d'altres anomalies cromosòmiques o mutacions en gens com *NOTCH1*, *TP53* i *FBXW7* (Landau *et al*, 2013; Falisi *et al*, 2014). En aquest sentit, s'ha descrit una alta freqüència d'adquisició de trisomia 19 en pacients amb trisomia 12 i hipermutacions als gens *IGHV* (Sellmann *et al*, 2007). Aquest subgrup de pacients amb trisomia 12 i 19 s'ha associat a una forta expressió de CD38, així com a l'expressió de l'immunoglobulina de superfície IgG, una variant poc freqüent de LLC que representa només un 6-10% dels pacients (Ibbotson *et al*, 2012).

Respecte a la patogènesi de la trisomia 12, les anàlisis d'expressió realitzades a nivell d'ARN i de proteïna han permès establir un efecte de dosi gènica en aquest cromosoma. Així, la trisomia 12 s'associa a una regulació positiva de gens distribuïts al llarg de tot el cromosoma, com ara *P27*, *CDK4*, *HIP1R*, *MYF6* i *MDM2* (Figura 12) (Haslinger *et al*, 2004; Kienle *et al*, 2005; Winkler *et al*, 2005; Porpaczy *et al*, 2009). La sobreexpressió de *HIP1R* és el marcador que millor correlaciona amb la trisomia, però la seva rellevància clínica és incerta (Porpaczy *et al*, 2009). S'ha proposat que la sobreexpressió *MDM2*, que intervé en la degradació de p53, pot conduir a la desregulació del cicle cel·lular en els pacients amb trisomia 12 (Koníková *et al*, 2003). D'altra banda, també s'ha descrit que els pacients amb trisomia 12 presenten una expressió diferencial d'altres gens, localitzats a altres cromosomes, entre els quals destaca l'increment de *BAX* o *E2F1*, i la disminució en l'expressió de *CD200* i *P2RY14* (Kienle *et al*, 2005; Porpaczy *et al*, 2009). *E2F1* és un factor de transcripció que intervé en la regulació de l'activitat proliferativa. S'ha relacionat l'increment de *E2F1* amb l'expressió de la quinasa *CDK4*, que es localitza a 12q14.1 i intervé en la regulació de l'activitat de *E2F1*. Així, un potencial mecanisme patogènic associat a la trisomia 12 podria ser un increment en la proliferació cel·lular mediat per *E2F1*, com a conseqüència de l'augment dosi-dependent de *CDK4* (Kienle *et al*, 2005). No obstant, fins a l'actualitat el mecanisme patogènic de la trisomia 12 no ha estat completament definit.

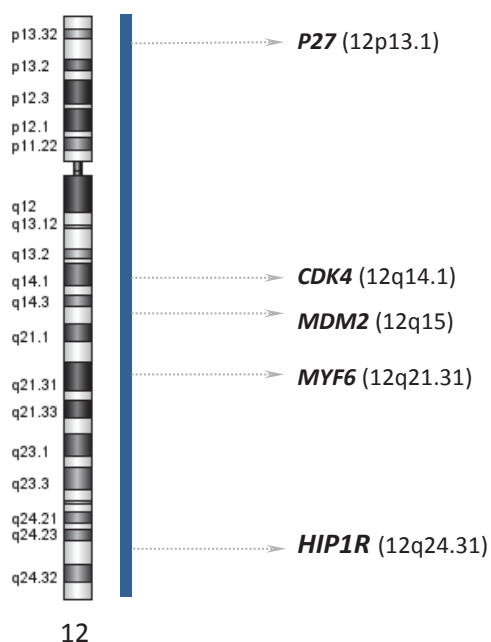


Figura 12. Esquema de la trisomia 12. En blau es marca el guany, s'indiquen els gens del cromosoma 12 proposats com a responsables de la patogènesi de l'alteració..

### 3.1.3. Delecció 11q

Les deleccions al braç llarg del cromosoma 11 [del(11q)] es detecten en un 5-20% de pacients amb LLC mitjançant FISH (Döhner *et al*, 2000; Zenz *et al*, 2010a). S'ha descrit que la regió mínima deleccionada comprèn les citobandes 11q22.3-q23.1 i inclou el gen *ATM* en la gran majoria de casos, així com d'altres gens com *RDX*, *FRDX1*, *RAB39*, *CUL5*, *ACAT*, *NPAT*, *KDELC2*, *EXPH2*, *MRE11*, *H2AX* i *BIRC3* (Figura 13). No obstant, la mida de la delecció és altament variable i sovint afecta més de 20 megabases (Gunn *et al*, 2009b; Marasca *et al*, 2013). Respecte el context genòmic d'aquesta delecció, l'elevat nombre d'anomalies cromosòmiques addicionals identificades en pacients amb del(11q) ha posat de manifest la inestabilitat genòmica associada a aquesta alteració (Ouillet *et al*, 2011b; Marasca *et al*, 2013). Donat que únicament el 8-30% de pacients amb del(11q) presenta mutacions al gen *ATM*, s'ha proposat que probablement hi hagi altres gens implicats en la patogènesi d'aquesta alteració (Ouillet *et al*, 2012). Un dels gens candidats és *BIRC3*, localitzat a 11q22. Mentre les mutacions de *BIRC3* s'identifiquen en només un 4% de pacients amb LLC al diagnòstic, la taxa de mutacions incrementa fins al 24% en pacients refractaris a tractaments amb fludarabina. L'absència de mutacions en pacients quimiosensibles ha suggerit l'associació entre les alteracions de *BIRC3* i el fenotip quimiofractari en LLC. A més, és destacable que les mutacions de *BIRC3* són mútuament excloents amb les alteracions de *TP53* (Rossi *et al*, 2012). No obstant, malgrat el rol d'*ATM* i *BIRC3* descrit en la patogènesi de la delecció, s'ha demostrat que les mutacions d'*ATM* tenen un impacte major que les alteracions

de *BIRC3* en la supervivència global i supervivència lliure de progressió dels pacients amb LLC i del(11q) tractats en primera línia (Rose-Zerilli *et al*, 2014).

Quant a les característiques clíniques, els pacients amb del(11q) típicament presenten grans adenopaties, i s'ha associat aquesta alteració a factors pronòstics adversos com l'absència de mutacions als gens *IGHV*. Respecte a l'evolució clínica dels pacients, la presència de del(11q) es relaciona amb una malaltia progressiva en la majoria de casos. A més, s'ha descrit que els pacients amb del(11q) presenten un inferior temps fins al primer tractament, així com una durada de la remissió i una supervivència global més curtes amb els tractaments quimioteràpics estàndards, en comparació als pacients sense del(11q) ni del(17p) (Wierda *et al*, 2011). D'altra banda, és destacable que la utilització dels nous tractaments basats en règims d'immunoquimioteràpia podria canviar el pronòstic advers de la del(11q) en pacients prèviament no tractats; s'ha descrit que en aquestes condicions la presència de del(11q) no té impacte en la supervivència lliure de progressió. No obstant, cal realitzar estudis de supervivència a llarg termini per confirmar aquest fet, així com l'impacte potencial que la heterogeneïtat genètica dins el grup de pacients amb del(11q) pot tenir en el curs clínic (Tsimberidou *et al*, 2009).

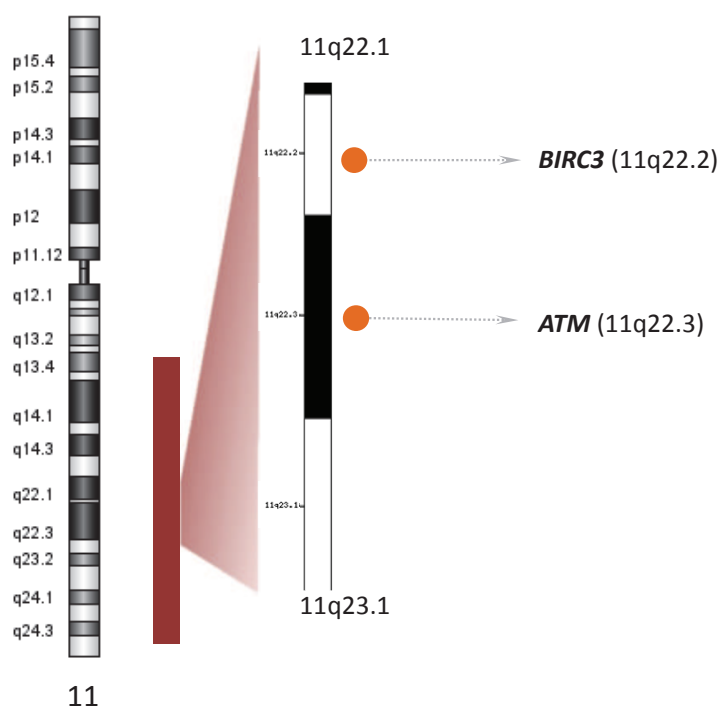


Figura 13. Esquema de la deleción de la regió 11q en LLC. En vermell es marca la deleción, els punts taronges indiquen mutacions en gens localitzats en aquesta regió.



### 3.1.4. Deleció 17p

La deleció de la regió 17p [del(17p)] es detecta per FISH en aproximadament el 3-8% de pacients amb LLC al diagnòstic (Döhner *et al*, 2000; Delgado *et al*, 2012). No obstant, com passa en altres tipus de limfomes, és una de les alteracions adquirides amb més freqüència després del tractament. S'ha descrit que fins a un 30% de pacients amb LLC refractària a tractaments de quimioteràpia presenten pèrdues de 17p (Stilgenbauer *et al*, 2009; Wawrzyniak *et al*, 2014).

Els pacients amb del(17p), que invariablement afecta el gen *TP53* (Figura 14), s'inclouen en la categoria pronòstica de risc més elevat, ja que representen el grup amb més requeriment de tractament, menor supervivència lliure de progressió i menor supervivència global dins dels pacients amb LLC. S'ha descrit que la del(17p) s'associa a un immunofenotip atípic, amb intensitat elevada de CD20, FMC7, CD79b i d'immunoglobulines de superfície. També s'ha relacionat amb una expressió de CD38 i ZAP-70 alta i amb l'absència de mutacions als gens *IGHV*, fet que concorda amb el mal pronòstic descrit en aquests pacients (Kröber *et al*, 2006; Quijano *et al*, 2008; Rassenti *et al*, 2008). Tot i tenir un efecte advers demostrat, s'ha descrit heterogeneïtat clínica entre els pacients amb del(17p) segons el moment d'adquisició de l'alteració: com a esdeveniment primerenc en el curs de la malaltia (*de novo*), o com a alteració secundària, que és el més freqüent (Landau *et al*, 2013). Així, els pacients amb del(17p) *de novo* presenten una supervivència global mediana més llarga que aquells amb del(17p) adquirida en un procés d'evolució clonal (4-5 vs. 1-1,5 anys) (Tam *et al*, 2009). A més a més, el percentatge de nuclis alterats per FISH també permet estratificar els pacients amb del(17p) en diferents subgrups de risc. Inicialment es va establir el punt de tall que predeïa pitjor evolució en el 8% (Döhner *et al*, 1995), però diversos estudis posteriors van incrementar el llindar a percentatges més elevats, de fins al 25% (Catovsky *et al*, 2007; Tam *et al*, 2009; Oscier *et al*, 2010; Delgado *et al*, 2012). De fet, l'estudi més recent demostra que la mida del clon alterat també té un impacte negatiu en la resposta al tractament i la supervivència global com a variable contínua (Delgado *et al*, 2012). D'altra banda, cal destacar que la detecció de mutacions de *TP53* en subclons molt minoritaris mitjançant les noves tècniques de *ultra-deep next generation sequencing* s'associa a pitjor supervivència. S'ha demostrat que aquests clons minoritaris són capaços d'expandir-se durant el transcurs de la malaltia i permeten predir resistència al tractament quimioteràpic en aquests pacients, fet que recolza la importància de les mutacions a *TP53* com a mutacions *driver* en LLC (Rossi *et al*, 2014). Pel que fa a la citogenètica, s'ha demostrat una associació significativa entre la del(17p) i deleccions a les regions 4p, 18p i 20p, així com alteracions al cromosoma 8 (pèrdua de 8p i guany de 8q) (Rudenko *et al*, 2008; Gunnarsson *et al*, 2011). Globalment, la pèrdua de *TP53* s'ha associat a una major complexitat genètica, però l'adquisició

d'alteracions addicionals durant el transcurs de la malaltia i l'efecte concret que aquestes provoquen no s'ha descrit.

Respecte a la patogènesi de la del(17p), l'efecte advers es pot explicar per la desregulació del cicle cel·lular causada per la pèrdua del gen *TP53*, localitzat a 17p13 (Hallek *et al*, 2010; Rossi *et al*, 2013). S'ha descrit que més del 75% de casos de LLC amb del(17p) presenta mutacions de *TP53* a l'al·lel restant. Aquest fet contrasta amb la baixa freqüència de mutacions de *TP53* en pacients sense deleció i suggereix una pressió selectiva per aquelles cèl·lules amb inactivació bial·lèlica de *TP53* (Zenz *et al*, 2008). S'ha demostrat que la inactivació monoal·lèlica de *TP53*, per qualsevol dels dos mecanismes, és suficient per generar un efecte negatiu al pronòstic. No obstant, aquells pacients amb deleció i mutació de *TP53* concomitants presenten una taxa de resposta a tractament menor, així com supervivència lliure de tractament o supervivència global més curtes (Zenz *et al*, 2010b; González *et al*, 2011). Un altre mecanisme que pot generar pèrdua de la funció de *TP53* és l'expressió de *MDM2*, una ubiquitina lligasa específica que intervé en la degradació de p53 i s'ha vist sobreexpressada en el 50-70% de pacients (Koníková *et al*, 2003). La sobreexpressió de *MDM2* implica la repressió d'un gran nombre de gens i miARNs dependents de p53, inclòs miR-34a, un efector *downstream* de p53. Mentre l'expressió de miR-34a és molt variable en pacients sense alteracions de *TP53*, s'ha descrit un nivell baix de miR-34a en pacients portadors de mutacions o deleció de *TP53*, o amb sobreexpressió de *MDM2*. Aquest microARN intervé en la regulació de la senescència, l'apoptosi i la detenció del cicle cel·lular; així, es pot establir una correlació entre la seva infraexpressió i un curs més agressiu (Asslaber *et al*, 2010). És destacable que, tot i que *TP53* és el gen més infraexpressat en pacients amb del(17p), diversos estudis d'expressió gènica han demostrat una expressió diferencial de molts altres gens relacionats amb apoptosi i regulació del cicle cel·lular. Així doncs, el mecanisme patogènic de la del(17p) inclou una desregulació de *TP53* i d'altres elements de la via de p53, però la pèrdua concomitant d'altres gens supressors de tumors podria contribuir al pronòstic molt advers d'aquest subgrup de pacients (Kienle *et al*, 2005; Grever *et al*, 2007; Fabris *et al*, 2008).

Com s'ha esmentat anteriorment, els pacients amb del(17p) o mutacions a *TP53* no responen als tractaments convencionals basats en règims de FC o FCR. Recentment, han aparegut molècules inhibidores de les vies clau en la fisiopatologia de cèl·lules B, de forma independent de p53 que es perfilen com a fàrmacs efectius en la LLC. Així, la utilització d'inhibidors de Bcl-2 o de la tirosina-quinasa BTK, entre d'altres, ha demostrat ser efectiva fins i tot en pacients amb del(17p) (Johnson *et al*, 2012; Davids *et al*, 2013; Burger *et al*, 2014; Cheng *et al*, 2014). Aquests resultats ofereixen un nou plantejament en el maneig d'aquest grup de pacients, en els quals la recomanació terapèutica actual en aquells malalts que assoleixen una

resposta completa és el transplantament al·logènic de cèl·lules mare hematopoètiques (Jain *et al*, 2012).

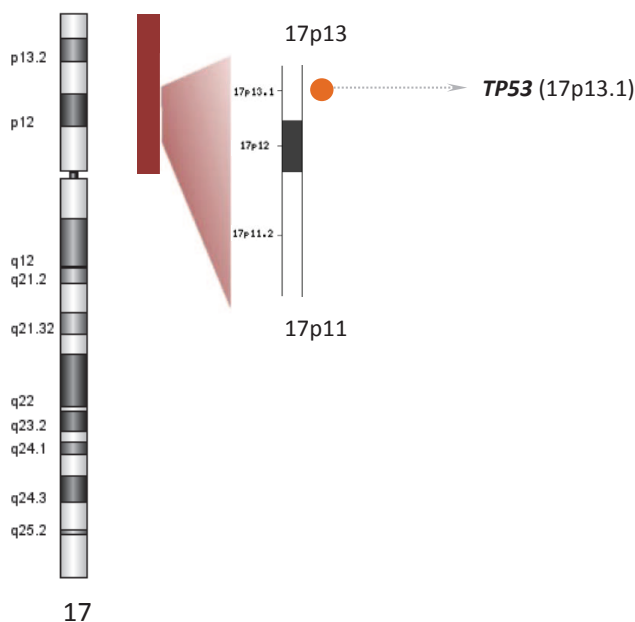


Figura 14. Esquema de la deleción de la regió 17p en LLC. En vermell es marca la deleción, el punt taronja indica mutació.

### 3.2. Altres alteracions detectades per citogenètica convencional

Inicialment, l'aplicació de la citogenètica convencional en LLC es va veure fortament limitada per la reduïda taxa mitòtica de la cèl·lula tumoral en cultiu (Juliusson *et al*, 1990). Per aquest motiu, la tècnica utilitzada per a l'estratificació del risc dels pacients amb LLC en base a les anomalies citogenètiques ha estat el FISH en interfase (Döhner *et al*, 2000). La tècnica de FISH permet detectar anomalies cromosòmiques sense necessitat d'obtenir metafases, però està limitada a les sondes utilitzades i subestima la complexitat real i l'heterogeneïtat en les alteracions cromosòmiques de la LLC. La utilització de nous mitògens per a cèl·lules B, com el lligand de CD40 o la combinació de nucleòtids CpG i interleucina 2, ha permès millorar el creixement de les cèl·lules de LLC en cultiu i incrementar la taxa de detecció d'alteracions cromosòmiques fins al 80% de pacients (Dicker *et al*, 2006; Haferlach *et al*, 2007; Heerema *et al*, 2010). Mitjançant aquests mètodes, s'ha demostrat que un 25-37% de pacients amb resultat de FISH normal presenta alteracions cromosòmiques no incloses al panell estàndard de FISH, que estudia la trisomia 12 i delecions a 11q, 13q i 17p (Haferlach *et al*, 2007; Rigolin *et al*, 2012). A l'estudi de Rigolin i col·laboradors, aquestes alteracions, que no s'haurien identificat per FISH, no correlacionaven amb altres factors de mal pronòstic com

la positivitat de CD38 o ZAP-70, o l'estat mutacional de *IGHV*. No obstant, sí que presentaven una forta associació amb estadis avançats de la malaltia i requeriment de tractament, així com amb un pitjor pronòstic, reflectit en supervivència lliure de tractament i supervivència global més curtes (Rigolin *et al*, 2012). La complexitat cariotípica i el tipus d'alteracions cromosòmiques detectades en LLC són molt heterogènies, però diversos autors han demostrat que el número d'alteracions detectades al cariotip es pot correlacionar amb el curs clínic dels pacients amb LLC (Jaglowski *et al*, 2012; Woyach *et al*, 2012; Travella *et al*, 2013; Baliakas *et al*, 2014).

### 3.2.1. Translocacions cromosòmiques

Contràriament al que passa en altres neoplàsies de cèl·lules B, la LLC no es caracteritza per la presència de cap translocació cromosòmica específica. No obstant, s'ha descrit que un 32-42% de pacients amb LLC presenten un ampli ventall de translocacions a l'estudi de citogenètica convencional (Mayr *et al*, 2006; Van Den Neste *et al*, 2007; Baliakas *et al*, 2014). L'impacte pronòstic que aquests reordenaments cromosòmics poden tenir en la LLC ha estat motiu de controvèrsia a la literatura. Mentre que inicialment les translocacions s'associaven a mal pronòstic independentment del nombre d'alteracions al cariotip (Mayr *et al*, 2006), els estudis més recents han restringit l'impacte advers a les translocacions desequilibrades o a aquelles que es detecten en un context de cariotip complex (Van Den Neste *et al*, 2007; Baliakas *et al*, 2014). Així, la presència de translocacions desequilibrades mantenia l'efecte advers en el pronòstic fins i tot quan es considerava en aquells pacients amb del(17p) (Van Den Neste *et al*, 2007).

Les alteracions equilibrades que afecten el gen *IGH* són poc freqüents en LLC. Tot i que només es detecten en un 4-9% de pacients (Cavazzini *et al*, 2008), algunes translocacions d'*IGH* han estat àmpliament caracteritzades a la literatura. Inicialment es va descriure que els pacients amb translocació d'*IGH* presentaven un curs clínic advers i que s'havien de considerar com a un grup pronòstic independent (Cavazzini *et al*, 2008), però estudis posteriors van posar de manifest que la parella cromosòmica involucrada en el reordenament d'*IGH* era rellevant en l'impacte clínic. En aquest sentit s'ha descrit que la t(14;19)(q32;q24), que afecta el *locus BCL3*, s'associa a la presència de trisomia 12 i cariotip complex, *IGHV* no mutat, morfologia i fenotip de LLC atípica, i a un pronòstic advers (Huh *et al*, 2011). Contràriament, la presència de reordenament *IGH/BCL2* [t(14;18)(q32;q24)] no s'associa amb la presència d'un cariotip complex o d'altres característiques que evidencien malaltia agressiva o pitjor evolució en aquests pacients (Put *et al*, 2009b).

Les translocacions del gen *MYC* s'identifiquen en menys d'un 1% de pacients

amb LLC, però representa un subgrup de pacients amb una major incidència de característiques de mal pronòstic dins la població general de LLC (Huh *et al*, 2008; Put *et al*, 2012). A més a més, la detecció de prolimfòcits en la majoria d'aquests casos ha suggerit que les translocacions de *MYC* podrien ser un esdeveniment secundari relacionat amb la transformació de la LLC (Huh *et al*, 2008; Put *et al*, 2012). Les translocacions de 13q són recurrents en LLC, de fet, s'ha descrit que el 10% de del(13q) identificades per FISH s'associen a una translocació de la regió 13q14 detectable al cariotip (Hruba *et al*, 2012). La descripció de múltiples parelles cromosòmiques en els reordenaments de 13q14 suggereix que la conseqüència d'aquests reordenaments no és l'activació d'un oncogen, sinó la pèrdua d'un gen supressor de tumors localitzat a 13q14 (Gardiner *et al*, 1997). En concordança amb aquesta teoria, gairebé tots els casos descrits a la literatura presenten també deleció del *locus* D13S3319, a 13q14 (Gardiner *et al*, 1997; Struski *et al*, 2007; Hruba *et al*, 2012). L'impacte pronòstic que aquestes translocacions poden tenir no ha estat clarament definit. Alguns autors han descrit una alta incidència de pèrdua de *RB1* en sèries petites de pacients amb translocació, i han suggerit que podrien representar un subgrup més agressiu dins els pacients amb del(13q) (Gardiner *et al*, 1997; Struski *et al*, 2007). D'altra banda, la majoria de reordenaments a 13q14 són aparentment equilibrats per citogenètica convencional, i diversos estudis han demostrat que les translocacions equilibrades *per se* no impliquen pitjor pronòstic en LLC (Mayr *et al*, 2006; Van Den Neste *et al*, 2007; Baliakas *et al*, 2014).

Quant a les translocacions de 17p, aquestes s'han descrit en un número limitat de pacients. No obstant, alguns autors han suggerit que el pronòstic de les deleccions de *TP53* pot veure's modificat quan la pèrdua de 17p és deguda a una translocació recurrent de 17p. Mentre s'han descrit quatre pacients amb el reordenament dic(8;17)(p11;p11), que no presenta impacte clínic demostrat (López *et al*, 2012b), el reordenament dic(17;18)(p11.2;p11.2) es va identificar en un 1,3% d'una sèrie de 1.213 pacients amb LLC i s'associava amb edats de diagnòstic menors i amb malaltia progressiva (Woyach *et al*, 2010).

En resum, les translocacions cromosòmiques *per se* no aporten un pitjor pronòstic en LLC. No obstant, alguns reordenaments recurrents que afecten gens concrets, com *BCL3*, *MYC*, o el braç p del cromosoma 17, haurien de considerar-se com a marcadors de pronòstic advers en l'estratificació del risc dels pacients amb LLC basada en les alteracions citogenètiques.

### 3.2.2. Cariotip complex

Aproximadament un 16% de pacients amb LLC presenta un cariotip complex, definit com la presència de tres o més alteracions cromosòmiques en l'anàlisi de citogenètica convencional (Haferlach *et al*, 2007; Baliakas *et al*, 2014). La detecció d'un cariotip complex s'ha associat amb expressió elevada de CD38 i absència de mutacions als gens *IGHV* (Haferlach *et al*, 2007). Pel que fa al·l'impacte clínic, un cariotip complex s'associava a temps fins al primer tractament i supervivència global menors en pacients tractats amb teràpies estàndard (Van Den Neste *et al*, 2007; Travella *et al*, 2013). A més, també era predictor de supervivència global inferior en pacients amb LLC refractàries o en recaiguda que eren tractats amb flavipiridol, un inhibidor de quinases dependents de ciclina (Woyach *et al*, 2012). Tractat com a variable contínua, el número d'alteracions del cariotip predeia supervivència lliure de recaiguda o supervivència global en pacients amb LLC que havien rebut un transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics amb condicionament de baixa intensitat. El punt de tall amb major poder predictiu en aquest tipus de pacients es va establir en cinc alteracions (Jaglowski *et al*, 2012). Cal destacar que s'ha descrit una associació significativa entre els cariotips complexos i la del(11q) o del(17p) (Haferlach *et al*, 2007; Jaglowski *et al*, 2012). No obstant, tot i que es podria postular que el mal pronòstic associat als cariotips complexos és degut a la presència d'aquestes delecions, l'estudi de Jaglowski i col·laboradors va demostrar que la complexitat cariotípica mantenia el valor predictiu en supervivència lliure de progressió i supervivència global inclús si es consideraven només els pacients amb alteracions d'alt risc per FISH (Jaglowski *et al*, 2012). A més, s'ha demostrat que la complexitat genòmica en la LLC sorgeix com a conseqüència d'un defecte en la reparació dels trencaments de doble cadena de l'ADN que inclou gens com *TP53*, però també *ATM* i altres gens localitzats a 11q, o el gen *RB1*, que es troba a 13q14 (Ouillete *et al*, 2010). L'impacte pronòstic de les alteracions cariotípiques suggereix que la implementació de la citogenètica convencional a la pràctica clínica és útil per identificar el subgrup de pacients amb LLC i cariotip complex, i adaptar el seguiment i l'estratègia terapèutica a les característiques clíniques i pronòstiques que presenten.

### 3.3. Alteracions genòmiques detectades per *microarrays*

Les tècniques convencionals d'anàlisi citogenètica han demostrat ser útils per l'estratificació pronòstica de la LLC. Tot i això, la citogenètica convencional està limitada per la necessitat d'obtenir cèl·lules en divisió, i l'anàlisi per FISH només ofereix una visió del genoma limitada a les sondes utilitzades. El desenvolupament de la tècnica de *microarrays* genòmics ha permès la detecció de guanys i pèrdues

de material genètic, amb una anàlisi d'alta resolució a nivell global del genoma. En general, el grau de concordança entre les alteracions detectades per FISH i les diferents plataformes de *microarrays* s'ha fixat entre el 79% i el 98% (Gunn *et al*, 2008; Gunnarson *et al*, 2010; O'Malley *et al*, 2011; Ouillette *et al*, 2011a). La majoria de resultats discordants eren deguts a una menor sensibilitat dels *microarrays* genòmics, amb un punt de tall que oscil·la entre el 20-30% de cèl·lules alterades (Schwaenen *et al*, 2004; Kujawski *et al*, 2008; Ouillette *et al*, 2011a). Per contra, un estudi posterior va descriure que algunes delecions de mida menor a les sondes de FISH només podien detectar-se per *microarrays* (Edelmann *et al*, 2012), i alguns autors han suggerit algorismes basats en el percentatge de cèl·lules tumorals a sang perifèrica per optimitzar la detecció d'alteracions genòmiques amb la combinació de les tècniques (Gunn *et al*, 2008; Kay *et al*, 2010).

L'aplicació dels *microarrays* genòmics ha permès obtenir informació sobre la mida i la regió mínima delecionada d'alteracions característiques de la LLC que no hauria estat disponible amb l'estudi del panell de FISH utilitzat en LLC. D'aquesta manera, es va descriure un pitjor pronòstic associat a aquelles pèrdues de 13q que, a més dels gens *DLEU2/MIR15A/MIR16-1* de la regió mínima delecionada, comprenien el gen *RB1* (Ouillet *et al*, 2008; Parker *et al*, 2011). L'estudi de *microarrays* d'HGC de Gunn i col·laboradors va demostrar la naturalesa multigènica de les delecions d'11q, així com l'existència d'una minoria de pèrdues a 11q que no inclouen el gen *ATM* i podrien no ser detectades amb l'anàlisi estàndard per FISH (Zenz *et al*, 2010a). En referència a les delecions a 6q, descrites en un 3-6% de pacients per citogenètica convencional i FISH (Stilgenbauer *et al*, 1999; Cuneo *et al*, 2004), diversos estudis de *microarrays* han descrit pèrdues de 6q amb una taxa de detecció del 3-17% de pacients (Chapiro *et al*, 2010; O'Malley *et al*, 2011; Edelmann *et al*, 2012). Contràriament al que succeeix en les altres alteracions recurrents, els estudis de *microarrays* han demostrat una gran heterogeneïtat en les delecions de 6q i no s'ha definit una regió mínima delecionada per tots els pacients. Edelmann i col·laboradors van descriure una regió de 2,5 Mb a 6q21 que estava involucrada en el 80% de les pèrdues de 6q, però no ha estat possible definir gens específics que puguin ser responsables de la patogènesi d'aquesta delecio (Edelmann *et al*, 2012).

D'altra banda, els estudis de *microarrays* han permès la descripció d'alteracions recurrents en LLC que no s'inclouen en el panell de FISH i que són críptiques, o detectades en molt baixa freqüència, per citogenètica convencional. Un estudi de Schwaenen i col·laboradors va descriure inicialment el guany de 2p, que inclou el gen *MYCN*, en una baixa proporció de casos amb LLC. A més, aquests casos presentaven un increment significatiu en els nivells de transcrit de *MYCN* que suggeria un rol potencial d'aquest en la patogènesi de la malaltia (Schwaenen *et al*, 2004). La sobreexpressió de *MYCN* va ser confirmada per estudis posteriors que, a més,

destacaven l'afectació dels gens *REL* i *MSH2* en molts dels guanys a la regió 2p (Figura 15). No obstant, cap d'aquests gens presentava una expressió diferencial en els pacients amb l'alteració (Chapiro *et al*, 2010). Respecte l'impacte pronòstic, la detecció de guanys de 2p augmenta fins al 28% en pacients en estadi Binet B/C no tractats, i s'ha postulat que es tracta d'un esdeveniment secundari associat a una supervivència global menor i a un risc de transformació a síndrome de Richter més elevat (Chapiro *et al*, 2010; Rinaldi *et al*, 2011). En aquells pacients amb guany de 2p i deleció de 11q concomitants s'ha descrit un curs clínic encara més agressiu, degut a una combinació de la sobreexpressió de *MYCN* i la disminució d'*ATM* (Gunnarsson *et al*, 2010). Les alteracions del cromosoma 8 (pèrdues de 8p i guanys de 8q) també s'han proposat com a marcadors pronòstics en LLC (Figura 16). Malgrat que representen només el 2-5% en la població general de pacients amb LLC, la freqüència d'alteracions a 8p i 8q incrementa fins al 80 i 44%, respectivament, en pacients amb deleció de 17p. A més, aquestes alteracions s'associen de forma independent a una menor supervivència global, inclús si només es consideren pacients amb pèrdua de 17p (Forconi *et al*, 2008; Rinaldi *et al*, 2011). Els estudis de *microarrays* també han permès definir alteracions petites que són recurrents i tenen una significança clínica indefinida, com les delecions submicroscòpiques a 22q11, en un 15% de pacients amb LLC, o els guanys de 20q13.12, en un 19%. S'han descrit canvis en el perfil d'expressió gènica associats a les dues alteracions, que posen de manifest l'elevada diversitat en les alteracions genòmiques de la LLC i proposen nous gens candidats que poden estar relacionats amb la patogènesi de la malaltia (Gunn *et al*, 2009a; Rodríguez *et al*, 2012b).

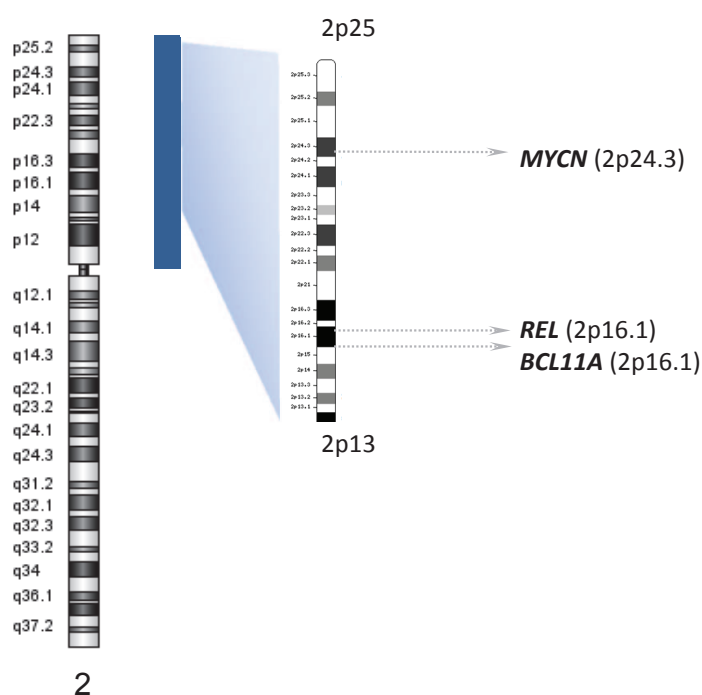


Figura 15. Esquema del guany de la regió 2p. En blau es marca el guany, s'indiquen els gens proposats com a responsables de la patogènesi de l'alteració.



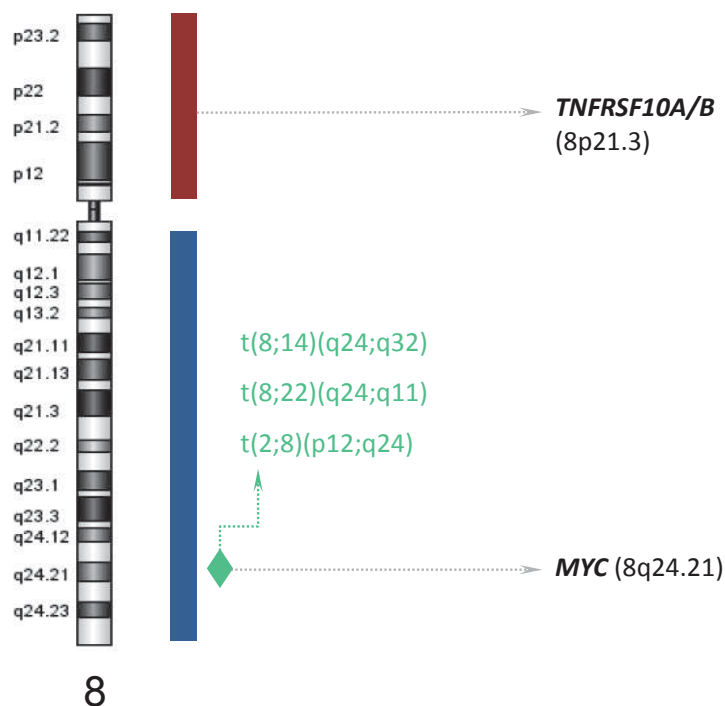


Figura 16. Esquema de les alteracions del cromosoma 8 descrites en LLC. En vermell es marca la deleció, en blau el guany i en verd les translocacions cromosòmiques. S'indiquen els gens proposats com a responsables de la patogènesi de les alteracions.

A part de les alteracions recurrents descrites en LLC, diversos autors han associat la complexitat detectada per *microarrays* amb un pitjor pronòstic, ja sigui en termes de temps fins al primer tractament menors, pitjors respostes al tractament o supervivència global més curta (Kujawski *et al*, 2008; Kay *et al*, 2010; Gunnarsson *et al*, 2011; O'Malley *et al*, 2011; Ouillette *et al*, 2011b). Recentment, s'ha descrit el fenomen de cromotripsis en almenys un 2-3% de tots els càncers, en el qual un sol esdeveniment produeix centenars de reordenaments localitzats en regions genòmiques concretes (Stephens *et al*, 2011). Edelman i col·laboradors van estudiar 353 pacients amb LLC per *microarrays* genòmics i van identificar set pacients amb cromotripsis, definida com la presència d'almenys deu canvis en el nombre de còpies detectats en un sol cromosoma. És destacable que els pacients amb cromotripsis presentaven temps al primer tractament i supervivència global més curts, així com una freqüència elevada d'*IGHV* no mutades o alteracions genòmiques d'alt risc (Edelman *et al*, 2012).

Globalment, els resultats descrits a la literatura han demostrat que les plataformes de *microarrays* són útils per l'estudi genòmic de la LLC, així com per la identificació de noves alteracions que podrien ser críptiques per les tècniques convencionals. Les alteracions descrites per *microarrays* podrien ser útils per millorar l'estratificació del risc als pacients amb LLC, així com per aprofundir en el coneixement de la malaltia. Tot i això, la seva aplicabilitat a la pràctica clínica encara és controvertida.

### 3.4. Alteracions detectades amb noves tecnologies, perspectives de futur en LLC

El desenvolupament de noves tècniques ha permès un gran avenç en la caracterització genètica de la LLC i ha proporcionat nous coneixements prometedors per al maneig de la malaltia. Durant els últims anys, la implementació de les tècniques de *next generation sequencing* (NGS) ha millorat el concepte que es tenia sobre la fisiopatologia anòmala de les cèl·lules B tumorals i també ha permès redefinir els subgrups pronòstics tradicionals. A més de les mutacions de *TP53*, prèviament caracteritzades, s'han descrit mutacions als gens *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3*, *ATM* i *MYD88* en un 3-15% de pacients amb LLC (Taula 5), ja sigui en combinació o de forma aïllada (Puente *et al*, 2011; Quesada *et al*, 2012; Rossi *et al*, 2013; Jeromin *et al*, 2014). L'aparició d'aquestes mutacions és conseqüència d'un procés dinàmic d'interacció entre diferents clons de la LLC i la pressió selectiva que els ofereix el microambient tumoral, que en determinen l'evolució clonal i la resposta al tractament que tindrà el pacient (Landau *et al*, 2013).

Els models de predicció de pronòstic utilitzats fins al moment utilitzaven factors clínics (ex. temps de duplicació limfocitària i estadis de Rai i Binet), marcadors moleculars (ex. expressió de CD38 i ZAP-70, i estat mutacional d'*IGHV*) i anomalies cromosòmiques (11q- i 17p-) en l'estratificació del risc dels pacients amb LLC. Amb la informació obtinguda per NGS, s'ha proposat la definició d'un model pronòstic integrat de dades citogenètiques i mutacionals que inclogui les noves mutacions, moltes de les quals han demostrat tenir un efecte independent en la supervivència dels pacients. Recentment, Rossi i col·laboradors han proposat un nou model que inclou quatre categories de risc (Figura 17): risc alt, aquells pacients portadors de del(17p)/mutacions de *TP53* i/o mutacions de *BIRC3*; risc intermedi, pacients amb del(11q) i/o mutacions de *NOTCH1* i/o *SF3B1*; risc baix, pacients amb trisomia 12 o cariotip normal; i risc molt baix, pacients amb del(13q) com a única alteració (Rossi *et al*, 2013). A més a més, el percentatge de cèl·lules alterades per FISH també ha guanyat rellevància en la estratificació pronòstica dels pacients, ja que s'ha demostrat que els pacients amb percentatges elevats de deleció 13q, 11q o 17p o trisomia 12 s'associen a un pitjor curs clínic que aquells amb percentatges reduïts (Hernández *et al*, 2009; Tam *et al*, 2009; Marasca *et al*, 2013; González-Gascón *et al*, 2015; Jain *et al*, 2015). En resum, els models pronòstics actuals basats en les anomalies genètiques estan essent modificats degut a la definició de noves mutacions, que contribuiran a refinar l'estratificació del risc i el maneig dels pacients amb LLC.

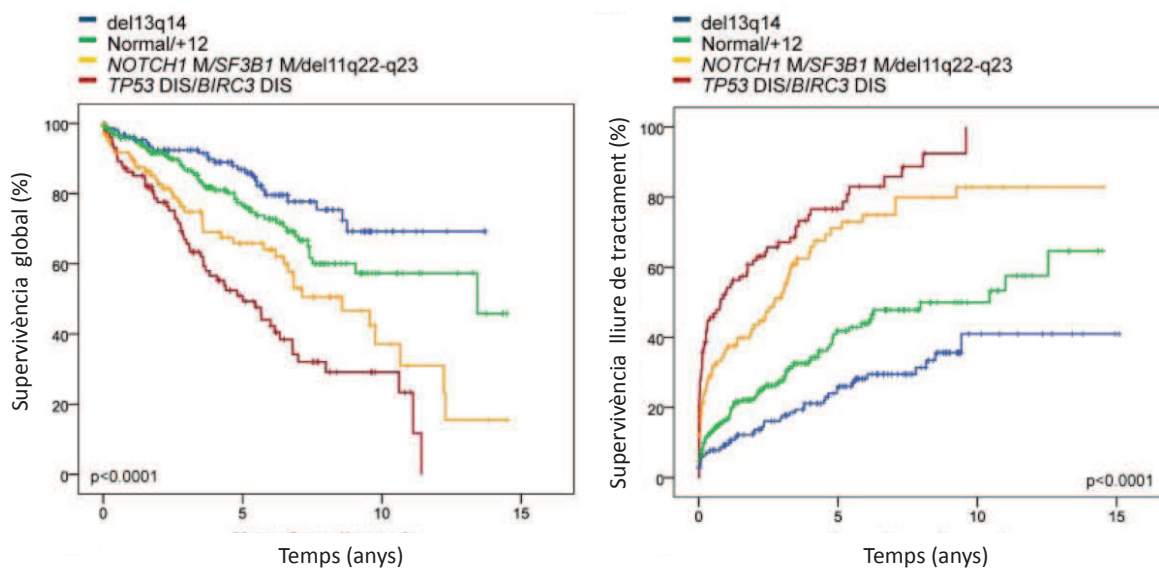


Figura 17. Supervivència global i supervivència lliure de tractament segons el model pronòstic integrat de dades mutacionals i citogenètiques (Adaptat de Rossi et al, 2013).

La Taula 5 mostra un resum dels principals gens amb mutacions recurrents en LLC i la taxa de mutació al diagnòstic descrita per a cadascun d'ells:

Gen	Taxa de mutació
<i>NOTCH1</i>	10 -15%
<i>MYD88</i>	3 -10%
<i>SF3B1</i>	10 -15%
<i>BIRC3</i>	< 5%
<i>ATM</i>	4 - 9%
<i>TP53</i>	4 - 8%

Taula 5. Principals gens recurrentment mutats en LLC.





# Hipòtesis i Objectius



## Hipòtesi i Objectius

La leucèmia limfàtica crònica (LLC) és una entitat clínicament molt heterogènia, en la qual s'ha demostrat que les alteracions citogenètiques i moleculars tenen un paper pronòstic rellevant. Pel que fa a la pràctica clínica, l'estratificació pronòstica dels pacients en base a les seves anomalies citogenètiques es restringeix a les quatre alteracions detectades per FISH (del(13q), trisomia 12, del(11q) i del(17p)) definides per Döhner i col·laboradors (Döhner *et al*, 2000). Alguns autors han demostrat que aquests grups són alhora molt heterogenis. D'altra banda, tot i que s'han descrit un gran nombre d'alteracions citogenètiques recurrents en LLC que no s'inclouen als panells de FISH de rutina, aquestes no estan prou caracteritzades com per definir un possible valor pronòstic aplicable a la pràctica clínica.

La hipòtesi d'aquesta tesi es basa en que les categories de risc citogenètic establertes actualment en LLC (13q, 12, 11q i 17p) poden ser millor estratificades si també es consideren les característiques pròpies de les alteracions, una informació disponible a les anàlisis citogenètiques aplicades actualment als laboratoris de diagnòstic hematològic (CC i FISH). A més, la definició del valor clínic d'altres alteracions genètiques conegudes, i de noves alteracions identificades per *microarrays* genòmics, també serà útil per a una millor estratificació dels pacients amb LLC. La integració d'aquesta informació amb la resta de dades clíniques contribuirà a un millor maneig clínic dels pacients amb LLC, amb un seguiment i una estratègia terapèutica adaptada a cada pacient.

L'objectiu global és realitzar la caracterització citogenètica dels pacients amb LLC i correlacionar les dades obtingudes amb el pronòstic d'aquest pacients. Per assolir aquesta fita es van marcar els següents objectius específics:

1. Estudiar la variabilitat entre els pacients amb LLC i deleció de 13q:
  - 1.1. Definir l'impacte pronòstic que té el número d'al·lels de 13q deleccionats i la mida del clon alterat al grup de pacients amb LLC i deleció de 13q aïllada per FISH
  - 1.2. Definir la rellevància clínica de les alteracions de 13q identificades al cariotip: comparar les característiques clínico-biològiques dels pacients amb deleccions o translocacions de la regió 13q14 per citogenètica convencional (CC) amb aquells que presenten deleció de 13q14 únicament detectada per FISH.
2. Determinar la utilitat de la incorporació dels estudis de *microarrays* genòmics en la pràctica clínica de la LLC: comparar el nivell de detecció d'anomalies cromosòmiques per *microarrays* amb el de les tècniques citogenètiques convencionals (CC i FISH), i analitzar la rellevància de les alteracions addicionals identificades per *microarrays*.





## Resultats

## Informe sobre la participació de la doctoranda en els articles presentats

La memòria de la Tesi doctoral "Combinació de tècniques d'anàlisi citogenètica en la leucèmia limfàtica crònica: estudi de l'heterogeneïtat dels pacients i aplicabilitat a la pràctica clínica" es presenta com a compendi de 3 publicacions. La participació de la doctoranda Anna M Puiggros Metje en cada treball és la que es detalla a continuació:

### **ARTICLE 1**

Puiggros *et al.* (2013) Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion.

*British Journal of Haematology*. doi: 10.1111/bjh.12479.

La doctoranda ha realitzat la selecció dels pacients a partir de la base de dades de LLC/LBM del GCECGH i del GELLC, que recull dades clíniques i biològiques de més de 2.000 pacients amb LLC o LBM de diferents centres de l'estat espanyol. Ha identificat aquells pacients que presentaven deleció de 13q aïllada per FISH abans d'haver rebut tractament, i n'ha fet una revisió exhaustiva per identificar les dades errònies o mancants. Amb la col·laboració dels centres d'origen de cada pacient, ha realitzat la depuració de les dades a analitzar. També ha realitzat gran part de l'anàlisi estadística en la que es basa l'estudi i ha redactat el manuscrit sota la nostra supervisió.

Índexs de qualitat: IF2013 = 4,959; 1r quartil de la categoria *Hematology*.

### **ARTICLE 2**

Puiggros *et al.* (2014) Interstitial 13q14 deletions detected in the karyotype and translocations with concomitant deletion of 13q14 in chronic lymphocytic leukemia (CLL): Different genetic mechanisms but equivalent poorer clinical outcome.

*Genes Chromosomes & Cancer*. doi: 10.1002/gcc.22188.

La doctoranda ha realitzat la selecció de pacients i recollida de mostres dels diferents centres participants de l'estat espanyol. Ha realitzat la valoració de les hibridacions per FISH amb les sondes D13S319 i *RB1*, i ha realitzat la separació cel·lular i extracció d'ADN d'aquells pacients inclosos a l'estudi mutacional de *SF3B1*, *MYD88* i *NOTCH1* dels quals el centre d'origen no disposava d'ADN. Finalment ha realitzat la depuració de les dades clíniques incloses a la base de dades, ha integrat els resultats de FISH i mutacions, i ha fet les anàlisis estadístiques pertinents. Sota la nostra revisió, ha dut a terme la redacció del manuscrit i les revisions que se n'han derivat.

**Índexs de qualitat:** IF2013 = 3,836; 2n quartil de les categories *Oncology* i *Genetics & Heredity*.

### **ARTICLE 3**

**Puiggros *et al.* (2013) Genomic arrays in chronic lymphocytic leukemia routine clinical practice: are we ready to substitute conventional cytogenetics and fluorescence *in situ* hybridization techniques?**

*Leukemia and Lymphoma*. doi:10.3109/10428194.2012.731598.

La doctoranda ha participat en la selecció de pacients i obtenció de mostres biològiques, així com en la recollida de dades clíniques. Ha portat a terme les separacions cel·lulars i les extraccions d'ADN, així com l'anàlisi de les dades crues obtingudes en les hibridacions dels *microarrays*. També ha realitzat la integració dels resultats obtinguts de *microarrays* amb els de les tècniques convencionals realitzades en la rutina diagnòstica i les anàlisis estadístiques incloses a l'article. Sota la nostra supervisió, ha redactat el manuscrit i les seves revisions.

**Índexs de qualitat:** IF2013= 2,602; 2n quartil de la categoria *Hematology*.

Dra. Blanca Espinet Solà  
Directora de Tesi

Dr. Francesc Solé Ristol  
Co-director de Tesi



## Article 1

*Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome  
in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627  
patients with isolated 13q deletion*

## Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion.

Anna Puiggros<sup>1,2</sup>, Julio Delgado<sup>3</sup>, Ana Rodriguez-Vicente<sup>4</sup>, Rosa Collado<sup>5</sup>, Anna Aventín<sup>6</sup>, Elisa Luño<sup>7</sup>, Javier Grau<sup>8</sup>, José Ángel Hernandez<sup>9</sup>, Isabel Marugán<sup>10</sup>, Maite Ardanaz<sup>11</sup>, Teresa González<sup>12</sup>, Alberto Valiente<sup>13</sup>, Mar Osma<sup>14</sup>, M<sup>a</sup> José Calasanz<sup>15</sup>, Carmen Sanzo<sup>7</sup>, Ana Carrió<sup>3</sup>, Margarita Ortega<sup>16</sup>, Rodrigo Santacruz<sup>3</sup>, Pau Abrisqueta<sup>16</sup>, Eugènia Abella<sup>1</sup>, Francesc Bosch<sup>16</sup>, Félix Carbonell<sup>5</sup>, Francesc Solé<sup>17</sup>, Jesús M<sup>a</sup> Hernández<sup>4</sup>, Blanca Espinet<sup>1,2</sup>, en representació del *Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica* (GCECGH) i el *Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica* (GELLC).

<sup>1</sup>Laboratori de Citogenètica Molecular, Laboratori de Citologia Hematològica. Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona; <sup>2</sup>Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques. Programa de recerca en càncer. IMIM-Hospital del Mar. Barcelona; <sup>3</sup>Secció d'Hematopatologia, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona; <sup>4</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, CSIC, Salamanca; <sup>5</sup>Servicio de Hematología, Consorcio Hospital General Universitario, Valencia; <sup>6</sup>Servicio de Hematología. Hospital Sant Pau, Barcelona; <sup>7</sup>Servicio de Hematología. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo; <sup>8</sup>Servei d'Hematologia, Institut Català d'Oncologia-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, IJC, Badalona; <sup>9</sup>Servicio de Hematología. Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid; <sup>10</sup>Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Clínico Universitario, Valencia; <sup>11</sup>Servicio de Hematología, Hospital Txagorritxu, Vitoria; <sup>12</sup>Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela; <sup>13</sup>Servicios de Genética y Hematología. Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona; <sup>14</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia; <sup>15</sup>Servicio de Citogenética, Departamento de Genética, Universidad de Navarra, Pamplona; <sup>16</sup>Laboratorio de Citogenética y Servicio de Hematología. Hospital Vall d'Hebron, Barcelona; <sup>17</sup>Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras, Badalona, Spain.

Les pèrdues a la regió 13q com a única alteració s'associen a bon pronòstic en la leucèmia limfàtica crònica (LLC). No obstant, s'ha demostrat que aquest grup de pacients és heterogeni, i es manté la controvèrsia sobre la rellevància clínica que les delecions bial·lèliques de 13q poden tenir. Aquest treball va analitzar les característiques clíniques i biològiques d'una sèrie àmplia de 627 pacients amb delecio de 13q aïllada per FISH procedents de la base de dades de LLC/LBM del GCECGH

i GELLC. Es van comparar els pacients amb deleció 13q monoal·lèlica (13qx1), deleció 13q bial·lèlica (13qx2), o coexistència d'ambdós clons (13qM). El grup més freqüent en la cohort estudiada va ser el 13qx1 (82,1%), mentre que els grups 13qx2 i 13qM representaven un 8,6% i 9,3% respectivament. La mediana del percentatge de nuclis alterats per FISH diferia significativament entre grups: 55%, 72,5% i 80% als pacients 13qx1, 13qx2 i 13qM, respectivament ( $P < 0,001$ ). D'altra banda, no es van observar diferències significatives en el curs clínic dels tres grups. De 84 pacients amb del(13q) es disposava d'estudis de FISH seqüencials: vuit perdien el segon al·lel de 13q durant el curs de la malaltia, però cap d'ells canviava del grup 13qx2 al 13qx1. El percentatge de cèl·lules alterades detectades per FISH tenia un impacte significatiu tant en la incidència acumulada de tractament als cinc anys com en la supervivència global, el punt de tall amb major poder predictiu va ser el 90%. En aquest treball es conclou que la pèrdua del segon al·lel de 13q no és suficient per aportar un pitjor pronòstic als pacients amb LLC, i que el pronòstic associat a la deleció de 13q aïllada es pot estratificar en funció del percentatge de cèl·lules alterades per FISH.



## Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion

Anna Puiggros,<sup>1,2</sup> Julio Delgado,<sup>3</sup> Ana Rodríguez-Vicente,<sup>4</sup> Rosa Collado,<sup>5</sup> Anna Aventín,<sup>6</sup> Elisa Luño,<sup>7</sup> Javier Grau,<sup>8</sup> José Ángel Hernandez,<sup>9</sup> Isabel Marugán,<sup>10</sup> Maite Ardanaz,<sup>11</sup> Teresa González,<sup>12</sup> Alberto Valiente,<sup>13</sup> Mar Osmá,<sup>14</sup> María José Calasanz,<sup>15</sup> Carmen Sanzo,<sup>7</sup> Ana Carrió,<sup>3</sup> Margarita Ortega,<sup>16</sup> Rodrigo Santacruz,<sup>3</sup> Pau Abrisqueta,<sup>16</sup> Eugènia Abella,<sup>1</sup> Francesc Bosch,<sup>16</sup> Fèlix Carbonell,<sup>5</sup> Francesc Solé,<sup>17</sup> Jesús María Hernández,<sup>4</sup> Blanca Espinet<sup>1,2</sup> and on behalf of Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH) and Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC).

<sup>1</sup>Laboratori de Citogenètica Molecular, Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia, Hospital del Mar, <sup>2</sup>Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques, Cancer Research Program, IMIM-Hospital del Mar, <sup>3</sup>Secció d'Hematopatologia, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, <sup>4</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, CSIC, Salamanca, <sup>5</sup>Servicio de Hematología, Consorcio Hospital General Universitario, Valencia, <sup>6</sup>Servicio de Hematología, Hospital Sant Pau, Barcelona, <sup>7</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, <sup>8</sup>Servei d'Hematologia, Institut Català d'Oncologia-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, IJC, Badalona, <sup>9</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid, <sup>10</sup>Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Clínico Universitario, Valencia, <sup>11</sup>Servicio de Hematología, Hospital Txagorritxu, Vitoria, <sup>12</sup>Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, <sup>13</sup>Servicios de Genética y Hematología, Complejo

### Summary

Losses in 13q as a sole abnormality confer a good prognosis in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). Nevertheless, its heterogeneity has been demonstrated and the clinical significance of biallelic 13q deletions remains controversial. We compared the clinico-biological characteristics of a series of 627 patients harbouring isolated 13q deletions by fluorescence *in situ* hybridization (FISH), either monoallelic (13q × 1), biallelic (13q × 2), or the coexistence of both clones (13qM). The most frequent 13q deletion was 13q × 1 (82.1%), while 13q × 2 and 13qM represented 8.6% and 9.3% of patients respectively. The median percentage of altered nuclei significantly differed across groups: 55%, 72.5% and 80% in 13q × 1, 13q × 2 and 13qM ( $P < 0.001$ ). However, no significant differences in the clinical outcome among 13q groups were found. From 84 patients with sequential FISH studies, eight patients lost the remaining allele of 13q whereas none of them changed from 13q × 2 to the 13q × 1 group. The percentage of abnormal cells detected by FISH had a significant impact on the five-year cumulative incidence of treatment and the overall survival, 90% being the highest predictive power cut-off. In conclusion, loss of the remaining 13q allele is not enough to entail a worse prognosis in CLL. The presence of isolated 13q deletion can be risk-stratified according to the percentage of altered cells.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukaemia, 13q deletion, monoallelic, biallelic, prognosis.

Hospitalario de Navarra, Pamplona, <sup>14</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia, <sup>15</sup>Departamento de Genética, Servicio de Citogenética, Universidad de Navarra, Pamplona, <sup>16</sup>Laboratorio de Citogenética y Servicio de Hematología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, and <sup>17</sup>Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras, Badalona, Spain

Received 10 April 2013; accepted for publication 12 June 2013

Correspondence: Blanca Espinet. Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia. Hospital del Mar. Pg. Marítim, 25-29. 08003 Barcelona, Spain.  
E-mail: bespinet@parcdesalutmar.cat

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is the most common leukaemia among the adult population in Western countries, and its biological behaviour and clinical course are highly variable. Despite the fact that mean survival rates in CLL average 10 years, some patients display an indolent course whereas others progress within a few months from diagnosis. Several prognostic markers have been described. Among them, recurrent cytogenetic abnormalities, such as deletions in 11q and 17p, have been related to aggressive disease and poor responses to treatment, while losses in 13q as a sole fluorescence *in situ* hybridization (FISH) lesion have been associated with good prognosis (Dohner *et al*, 2000). Although it is the most common cytogenetic abnormality detected by FISH, the biological basis of 13q deletion is still unknown. Several studies have demonstrated that patients with del(13q) are a heterogeneous group. First, the minimal deleted region in 13q14 involves the microRNA genes *MIR15A* and *MIR16-1*, which have been suggested as the tumour suppressor genes responsible for CLL pathogenesis (Calin *et al*, 2002). However, it has been proven that CLL cells with larger deletions that include the *RB1* gene have a distinct molecular behaviour and are associated with a poorer clinical course (Ouillette *et al*, 2008, 2011; Mosca *et al*, 2010; Mian *et al*, 2012). The size of the abnormal clone detected by FISH can also modulate the prognosis of 13q deletion. Those patients with a higher percentage of altered nuclei have significantly shorter time to first treatment and overall survival. Nonetheless, the optimal cut-off point that defines a poorer outcome of 13q deletion differs between published works and ranges from 65.5% to 80% (Hernandez *et al*, 2009; Van Dyke *et al*, 2010; Dal Bo *et al*, 2011; Orlandi *et al*, 2012). Moreover, subsequent molecular studies have provided biological evidences underlying the clinical heterogeneity related to the size of the abnormal 13q- clone (Rodríguez *et al*, 2012).

Regarding the number of deleted alleles, whereas about 70% of the 13q deletions are monoallelic (13q × 1), some cases harbour biallelic (13q × 2) or mosaic mono/biallelic (13qM) losses (about 15% each) (Reddy, 2006). It is still controversial whether the detection of homozygous deletions of 13q significantly modifies the clinical evolution of CLL patients. It has been hypothesized that biallelic deletions result from an evolution of the monoallelic clones and therefore represent a more aggressive abnormality (Dewald *et al*, 2003; Chena *et al*, 2008; Van Dyke *et al*, 2010). Large series of CLL patients that analyse the clinical impact of biallelic 13q losses are scarce. For this reason, the present study aimed: (i) to describe and compare the clinical and biological characteristics of patients harbouring monoallelic and biallelic 13q deletions by FISH in a large series of patients (ii) to analyse whether the number of deleted 13q alleles has a significant impact on the clinical outcome of CLL patients.

## Patients and methods

### Patients

An electronic database containing information from 2452 patients with CLL or monoclonal B cell lymphocytosis from 25 Spanish institutions was retrospectively screened for CLL patients with 13q deletion. CLL patients were diagnosed according the World Health Organization (WHO) classification (Müller-Hermelink *et al*, 2008), requiring the presence of at least  $5 \times 10^9$  clonal B lymphocytes/l confirmed by flow cytometry. A total of 627 patients who carried a 13q deletion as a sole abnormality detected in the routine FISH analysis at diagnosis or prior to any treatment were selected. Treatments were administered following standard criteria for therapy and response evaluation (Hallek *et al*, 2008). This study was

performed in accordance with national and international guidelines (Professional Code of Conduct, Declaration of Helsinki), and approved by the Ethical Committee of our Institution (ref. 2013/5073/I).

#### *Fluorescence in situ hybridization and conventional G-banding cytogenetics*

FISH analyses were performed mainly on peripheral blood (PB, 557 cases) and bone marrow (BM, 70 cases) samples. The FISH panel used in all the cases included specific probes for *TP53* (17p13), *ATM* (11q22), *D13S319* (13q14) and the centromeric region of chromosome 12. In 313 patients (284 PB and 29 BM), the studied sample had been cultured for 72 h with tetradecanoylphorbol acetate (TPA) and successful conventional G-banding cytogenetics (CGC) results were also available. Sequential FISH analyses during the follow-up were performed in 84 patients (74 PB and 10 BM).

#### *Clinical data*

Demographic and clinical data from the selected patients were collected. Clinical information recorded at diagnosis included age, Binet stage and physical examination. Analytical parameters at diagnosis included absolute white blood cell and lymphocyte counts, haemoglobin level, platelet count, as well as lactate dehydrogenase (LDH) and serum beta2-microglobulin (B2M) concentrations. Furthermore, prognostic factors, such as CD38 and ZAP70 expression and mutational status of immunoglobulin heavy chain (*IGHV*), were collected when available. Dates of diagnosis, first therapy and last follow-up were also recorded.

#### *Statistical analysis*

For the purpose of this study, patients were classified into three groups depending on the type of 13q deletion: monoallelic ( $13q \times 1$ ), biallelic ( $13q \times 2$ ) and mosaic (13qM), the latter included those patients with two independent clones harbouring both monoallelic and biallelic deletions. Chi-square or Fisher exact tests were performed to compare discrete variables between 13q groups, while comparisons of continuous variables were assessed by the Kruskal–Wallis test.

Time to first treatment was defined as the time from diagnosis to start of treatment or last follow-up, considering CLL-unrelated deaths as competing events. Cumulative incidence estimates were calculated using the CumIncidence.R function provided by Dr. Luca Scrucca, University of Perugia, Italy, and the effect of different covariates was evaluated using Gray's test (Scrucca *et al*, 2007). Those variables that had a significant impact on the five-year cumulative incidence of treatment (TtFT) were fitted into a competing risk regression analysis using the *crr-adson.R* function, also provided by Dr. Scrucca (Scrucca *et al*, 2010). The proportional hazard

assumption was tested by plotting Schönfeld residuals against time. Cut-off points for absolute lymphocyte count, B2M and percentage of cells harbouring the 13q deletion that best predicted TtFT were calculated using maximally selected rank statistics (maxstat package, R software). Overall survival (OS) was defined as the time from diagnosis to death or last follow-up, and was evaluated using Kaplan–Meier plots. The effect of different covariates was evaluated using the log-rank test. Cox proportional hazards regression models were performed to assess the maintenance of their independent predictive value. Statistical analyses were performed using SPSS v.18 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and R v. 2.15.0 (R Project for Statistical Computing). *P* values < 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

### *Patient characteristics*

FISH studies indicated that 1354/2452 patients (55.2%) harboured 13q deletions. Those patients that presented a concomitant anomaly by FISH or whose FISH information was obtained after receiving treatment were excluded. Overall, a total of 627 (25.6%) previously untreated patients with CLL presented isolated 13q deletion. Median time from diagnosis to detection of 13q deletion was 1 month (range: 0–266). Most of the patients harboured monoallelic losses and were classified in the  $13q \times 1$  group (515/627, 82.1%), while isolated biallelic losses ( $13q \times 2$ ) or coexistence of clones with both monoallelic and biallelic deletions (13qM) were less commonly detected (8.6% and 9.3% patients respectively). Most patients had an asymptomatic disease diagnosed at an early stage (89.3% Binet A). ZAP70 positive cases were more frequently detected in  $13q \times 1$  group. However, no other significant differences in the baseline clinical and biological features among the three 13q groups were found (Table 1). When the  $13q \times 2$  and 13qM groups were combined and compared to  $13q \times 1$  patients, none of the baseline clinical and biological characteristics were significantly different (Table S1).

### *13q deletion identified by FISH*

Considering the potential bias in the percentages of the FISH results owing to the culture, we initially compared results from different specimens studied. No significant association between the specimen studied (PB or BM, cultured or not) and the percentage of altered nuclei or the type of 13q deletion was found. Thus, 13q characteristics were analysed irrespective of the sample used for each patient.

The percentages of abnormal nuclei observed in the FISH analyses were wide-ranging (from 5 to 100%). Nonetheless, the median percentage of altered nuclei significantly differed across groups: 55%, 72.5% and 80% in the  $13q \times 1$ ,  $13q \times 2$  and 13qM groups, respectively ( $P < 0.001$ ). Focusing on the 13qM group, the median percentage of both monoallelic and

Table I. Baseline characteristics of patients at diagnosis.

Patients characteristics	del (13q × 1) (n = 515)	del (13q × 2) (n = 54)	del (13qM) (n = 58)	P -value
Age at diagnosis (years)	66 (28–92)	65 (43–90)	69 (44–88)	0.752
Male	314 (61%)	33 (61.1%)	30 (51.7%)	0.397
Binet stage (n = 616)				
A	454 (89.4%)	43 (84.3%)	53 (93%)	0.631
B	38 (7.5%)	5 (9.8%)	3 (5.3%)	
C	16 (3.1%)	3 (5.9%)	1 (3.2%)	
Absolute white blood cell count ( $\times 10^9/l$ )	18.5 (2.9–357)	20.7 (3.8–150)	20 (6.4–63)	0.294
Absolute lymphocyte count ( $\times 10^9/l$ )	12.9 (1.9–287)	15.3 (1.8–114.9)	13.8 (1.7–60.1)	0.334
Haemoglobin (g/l)	140 (64–180)	140 (110–170)	140 (60–180)	0.343
Platelet count ( $\times 10^9/l$ )	196 (40–560)	194 (83–470)	200 (74–450)	0.713
Lactate dehydrogenase (iu/l)	314 (81–1420)	318 (103–575)	330 (151–658)	0.945
Beta-2 Microglobulin (mg/l)	2.0 (0.6–17.4)	1.9 (1–5.7)	2.3 (1–6.7)	0.086
Adenopathies (n = 512)	124 (29.5%)	11 (31.4%)	12 (21.1%)	0.706
Splenomegaly (n = 615)	43 (8.5%)	3 (5.8%)	3 (5.2%)	0.707
Hepatomegaly (n = 425)	25 (4.9%)	2 (3.8%)	3 (5.2%)	1.000
ZAP70 positive (n = 278)*	67/223 (30%)	7/19 (36.8%)	3/36 (8.3%)	0.009
CD38 positive (n = 418)*	57/345 (16.5%)	4/33 (12.1%)	6/40 (15%)	1.000
Unmutated <i>IGHV</i> (n = 148)	29/124 (23.4%)	4/18 (22.2%)	1/6 (16.7%)	1.000
Conventional cytogenetics (n = 313)				
Abnormal karyotype	67/251 (26.7%)	5/19 (26.3%)	15/43 (34.9%)	0.535
Additional abnormalities to del(13q)	43/251 (17.1%)	5/19 (26.3%)	12/43 (27.9%)	0.162
Follow-up (months)	52 (0–250)	53 (0–196)	39 (0–250)	0.389

Values are given as median (range) or number (%).

\*Positivity was considered when ZAP70 > 20% and CD38 > 30%.

biallelic clones found in each patient were not significantly different (35% and 27.5%, respectively;  $P = 0.651$ ). Also, no predominance of any of the clones was observed in the 13qM group.

From 84 patients with sequential FISH studies, 14 patients (16.7%) changed their 13q status. Whereas 13q deletion disappeared in six patients who had been previously treated, eight lost the remaining allele of 13q. Only half of these patients who progressed from monoallelic to biallelic 13q deletion required treatment during the follow-up.

#### Conventional G-banding cytogenetics

Among the 313 patients with available CGC results, 87 (27.8%) showed an abnormal karyotype. While 27 of them (31%) carried large 13q deletions as a sole abnormality, the remaining cases showed alterations involving several chromosomes. Regarding the additional abnormalities, the most frequently detected were translocations involving 13q14 (18/313, 5.8%), 6q deletions (7/313 patients, 2%), and translocations involving 14q32 (3/313, 1%). Remarkably, none of the detected 13q translocations were recurrent in the present cohort. CGC identified a median of one single aberration per abnormal case (range: 1–18), and only nine patients (2.9%) carried a complex karyotype. Interestingly, all of these nine patients were diagnosed at A Binet stage lacking poor prognosis features (CD38 and ZAP70 expression), and only

two of them required treatment during the follow-up (median 40 months, range 0–254).

#### Time to first therapy

At the end of the study, a total of 195 patients (31.1%) needed treatment. We did not find significant differences regarding the proportion of treated patients in each FISH group. The distribution of treated patients was as follows: 31.2% (161/515) in 13q × 1 patients, 35.2% (19/54) in 13q × 2 patients and 25.9% (15/58) in the 13qM group. Furthermore, in the univariate analysis, the five-year cumulative incidence of treatment (TtFT) was not significantly different among all three 13q groups: 30% (95% confidence interval [CI] 25–35%) for 13q × 1, 28% (13–43%) for 13q × 2, and 29% (13–45%) for 13qM ( $P = 0.696$ ). TtFT was also not statistically different when 13q × 2 and 13qM were combined and compared to 13q × 1 ( $P = 0.995$ ). In contrast, the percentage of abnormal cells in the FISH analysis had a significant impact on the TtFT in the studied cohort (Table II, Fig 1A), with 90% being the highest predictive power cut-off. When considering additional abnormalities detected by CGC, no differences in the TtFT were found between patients with normal karyotype or isolated del(13q) and those with other additional large abnormalities. On the other hand, absolute lymphocyte count (ALC), serum B2M, as well as CD38 and ZAP70 positivity, showed a significant

Table II. Univariate and multivariate analysis of five-year cumulative incidence of treatment (TtFT).

Variable		Univariate		Multivariate	
		TtFT (95% CI)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value
Percentage of cells with 13q deletion	>90%	45% (31–59)	0.005	1.71 (1.02–2.87)	0.043
	<90%	28% (24–32)			
CD38 expression*	Positive	67% (52–82)	<0.001	2.86 (1.85–4.40)	<0.001
	Negative	24% (19–29)			
ZAP70 expression*	Positive	41% (25–55)	0.005		N.S.
	Negative	26% (18–33)			
Beta2-microglobulin	>3 mg/l	61% (49–73)	<0.001	2.28 (1.45–3.60)	<0.001
	<3 mg/l	25% (20–30)			
Absolute lymphocyte count	>40 × 10 <sup>9</sup> /l	73% (61–85)	<0.001	5.17 (3.00–8.90)	<0.001
	<40 × 10 <sup>9</sup> /l	25% (21–29)			

95% CI, 95% confidence interval; N.S., Not significant.

\*Positivity was considered when ZAP70 > 20% and CD38 > 30%.

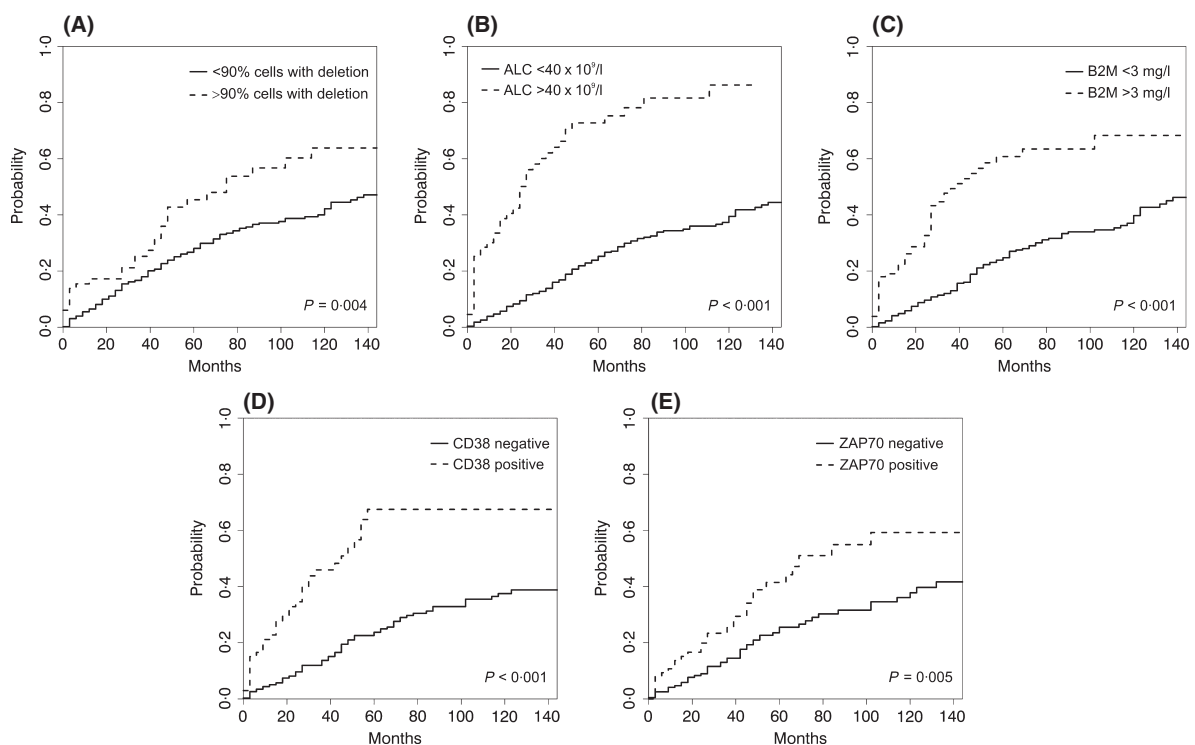


Fig 1. Five-year cumulative incidence of treatment (TtFT) for percentage of 13q deleted cells (A), absolute lymphocyte count (ALC) (B), serum beta2-microglobulin (B2M) (C), CD38 positivity (D) and ZAP70 positivity (E).

impact on the TtFT (Table II, Fig 1 B–D). In the multivariate analysis, all variables except for ZAP70 positivity preserved an independent effect on TtFT.

#### Overall survival

Overall, 94 patients (15%) died after a median follow-up of 51 months (range: 0–250). The 10-year OS was not

significantly different among 13q groups: 73% (95% CI: 67–79%) for 13q × 1, 88% (76–100%) for 13q × 2, and 80% (74–96%) for 13qM ( $P = 0.572$ ). It is remarkable that patients with 90% or more cells with 13q deletion had a significantly shorter OS compared to patients with a lower allelic burden ( $P = 0.044$ ). Other variables, such as CD38, B2M, ALC, age at diagnosis and Binet stage (A vs. B or C), also presented a significant impact in the overall survival

**Table III.** Univariate and multivariate analysis of overall survival (OS).

Variable		Univariate		Multivariate	
		Median OS (95% CI) in months	P -value	Hazard ratio (95% CI)	P -value
Percentage of cells with 13q deletion	>90%	148.0 (82.6–213.5)	0.044		N.S.
	<90%	Not reached			
CD38 expression*	Positive	91.4 (74.2–108.6)	<0.001	2.70 (1.46–5.01)	0.002
	Negative	Not reached			
Beta2-microglobulin*	>3 mg/l	76 (44.6–107.4)	<0.001		N.S.
	<3 mg/l	Not reached			
Absolute lymphocyte count	>40 × 10 <sup>9</sup> /l	131.6 (116.5–146.7)	0.004		N.S.
	<40 × 10 <sup>9</sup> /l	Not reached			
Age	>65 years	142.2 (113.3–171.2)	<0.001	4.59 (2.10–10.05)	<0.001
	<65 years	Not reached			
Binet stage	A	Not reached	0.037		N.S.
	B–C	140.4			

95% CI, 95% confidence interval; N.S., Not significant.

\*Positivity was considered when CD38 > 30%.

(Table III). However, Cox regression analysis only maintained independent prognostic value for CD38 positivity, age at diagnosis and B2M levels.

## Discussion

Chromosomal abnormalities identified by FISH play an important role in CLL prognostic stratification. Historically, patients with isolated 13q deletion were associated with good prognosis (Dohner *et al*, 2000), but recent studies have shown that there is a significant heterogeneity in the outcome of these patients (Hernandez *et al*, 2009; Van Dyke *et al*, 2010; Dal Bo *et al*, 2011; Orlandi *et al*, 2012). Given that the clinical impact of biallelic vs. monoallelic 13q losses remains controversial, we compared the clinical and biological features of a large series of patients with CLL harbouring 13q deletions by FISH in order to assess whether the number of 13q deleted alleles had a significant impact on the clinical course of the disease.

We did not find significant differences in the baseline characteristics and clinical outcome among CLL patients with monoallelic, biallelic or mosaic 13q deletions. Our results are in concordance with previous studies that did not find any association between the proportion of patients requiring treatment or TtFT and the number of 13q deleted alleles (Van Dyke *et al*, 2010; Garg *et al*, 2012). In contrast, other authors found that the 13q × 2 group included a major proportion of patients with advanced Binet or Rai stages and was associated with shorter TtFT, but only by univariate analysis (Chena *et al*, 2008; Hernandez *et al*, 2009; Orlandi *et al*, 2012). Regarding the biological mechanism responsible for biallelic deletions, Dewald *et al* (2003) demonstrated a different origin in each of the deleted alleles and hypothesized that the 13q × 2 group had a worse clinical behaviour based on the clonal evolution of the 13q deletion. In

addition, Chena *et al* (2008) suggested that the coexistence of clones harbouring both monoallelic and biallelic deletions in a single patient was also a proof of clonal evolution. Finally, sequential FISH analyses demonstrated clonal evolution in those patients who acquired a new biallelic clone or loss of *RBI* at follow-up (Chena *et al*, 2008). We analysed serial 13q FISH studies performed in 84 patients and the characteristics from the 13qM group in order to study clonal evolution. Despite identifying mosaics at the same frequency described in the literature (Chena *et al*, 2008), our results were not informative to hypothesize about the mechanism of evolution from the original 13q- clone. In contrast to previous studies, there was no predominance of either biallelic or monoallelic clones in the 13qM group (Reddy, 2006; Chena *et al*, 2008). Furthermore, the median percentage of each type of clone found in a single patient was not significantly different. Our sequential FISH studies are in concordance with the supposed clonal progression to biallelic 13q deletion. Among 14 patients who changed their 13q status, eight patients lost the remaining 13q allele, while the abnormal clone was not detected in six patients due to treatment response. Overall, none of the 84 patients with sequential FISH studies changed from 13q × 2 to 13q × 1 group.

We among others have found divergences in the median percentage of abnormal nuclei across 13q groups (Orlandi *et al*, 2012). However, other studies did not detect significant differences in the median percentage of abnormal nuclei (Garg *et al*, 2012) or in the proportion of patients with more than 80% of deleted nuclei (Hernandez *et al*, 2009). Notably, differences in the proportion of altered nuclei by FISH observed in our study were not enough to entail a different clinical course between 13q × 1, 13q × 2 and 13qM groups.

When considering the percentage of 13q-deleted cells, regardless of the type of 13q deletion, a significant impact on

prognosis was observed. Those patients with more than 90% of deleted nuclei showed a significantly shorter TtFT and OS. Moreover, the independent effect of this covariate on TtFT was also preserved in the multivariate analysis. The clinical significance of the percentage of 13q deletion by FISH has been recently described by many groups. However, the cut-off with the highest predictive power in our series differs from those previously published, which ranged from 65.5 to 80% (Hernandez *et al*, 2009; Van Dyke *et al*, 2010; Dal Bo *et al*, 2011; Orlandi *et al*, 2012). Of note, nearly half of our FISH analyses were performed on TPA-stimulated PB cultures, whereas all previous studies were carried out on uncultured material. It has been demonstrated that the FISH detection rate of 13q deletion increases when the analysed cells proceed from TPA-stimulated conventional cytogenetics cultures due to an expansion of the 13q- clone during the culture (Delgado *et al*, 2010). As we did not find significant differences in our cohort, we assume that both types of samples could equally be considered in our analyses and the obtained 90% cut-off could be compared to those previously described. Indeed, the percentage of 13q deletion had a predictive value as a continuous variable (Van Dyke *et al*, 2010; Orlandi *et al*, 2012). We also found significant differences in TtFT when the described thresholds were applied (data not shown). Subsequently, our results from the largest series of CLL patients with isolated 13q deletion confirm that this group can be risk-stratified according to the percentage of altered cells.

With regard to the biological basis underlying 13q deletions, *MIR15A* and *MIR16-1*, located in the minimal deleted region (MDR), have been described to exhibit a tumoural suppressor function in CLL (Calin *et al*, 2002; Klein *et al*, 2010). In addition, it has been extensively demonstrated that large 13q losses involving *RB1* are associated with shorter TtFT and OS (Dal Bo *et al*, 2011; Parker *et al*, 2011; Mian *et al*, 2012). Biallelic 13q deletions are characteristically small and do not involve *RB1* (Ouilllette *et al*, 2008). Thus, we could hypothesize that the absence of significant differences in the outcome of 13q × 1 and 13q × 2 groups in the present study could be related to the deletion size. Although *MIR15A*- and *MIR16-1*- dependent pathways could be less deregulated by the loss of a single allele, the tumourigenic effect of 13q × 1 and 13q × 2 deletions would be equivalent to the deregulation of other pathways due to the loss of additional genes, such as *RB1* or *DLEU7*, in 13q × 1 deletions. A further feasible theory is the inactivation of the remaining chromosome copy in 13q × 1 group due to epigenetic silencing at 13q14 by DNA methylation of CpG islands (Mertens *et al*, 2006) or histone deacetylation (Sampath *et al*, 2012).

In conclusion, monoallelic and biallelic 13q deletions do not show significant differences in the baseline characteristics of CLL patients. Detection of cases with clonal evolution and differences observed in the percentage of altered cells of both

groups suggested that biallelic loss could be a secondary event in the course of the disease. Nonetheless, its effect would not be enough to entail a worse prognosis. In addition, the accumulation of high percentages of cells carrying the deletion is an independent factor that could stratify patients with 13q deletion. Therefore, isolated 13q deletion, when detected in more than 90% of nuclei, should not be considered as a good prognostic marker.

## Acknowledgements

The following investigators also contributed providing clinical or laboratory data to this study: Neus Ruiz-Xivillé and Christelle Ferrá (Hospital Germans Trias I Pujol, Badalona); Eva Gimeno, Marta Salido and Ana Ferrer (Hospital del Mar, Barcelona); Maria Jose Marco (Hospital General, Castellon); Eva Arranz and Javier Loscertales (Hospital La Princesa, Madrid); Marcos González (Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca); Isana Benet and María José Terol (Hospital Clinic, Valencia); Jose Cervera (Hospital La Fe, Valencia); David Ivars (Consorcio Hospital General Universitario, Valencia), Eugenia Fernández (Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela), Francisco Ortuño (Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia), Eduardo Olavarría (Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona), Ana Carla Oliveira (Hospital de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat), Ana Batlle (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander) and Carolina Muñoz (Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid). This work was supported by the following grants: PI11/01621 from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness; RD12/0036/0044 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), FEDER, 2009/SGR541 from Generalitat de Catalunya and "Xarxa de Bancs de tumors" sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC).

## Authorship and Disclosures

AP and BE designed the research study, provided patient data, analysed the data and wrote the paper. JD provided patient data and performed statistical analysis. ARV, RC, AA, EL, JG, JAH, IM, MA, TG, AV, MO, MJC, CS, AC, MO, RS, PA, EA, FB, FC, FS and JMH provided patient data. All authors read the last version of the manuscript. The authors made no disclosure of conflicts of interest.

## Supporting Information

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

**Table S1.** Baseline characteristics of patients at diagnosis, combining 13q × 2 and 13qM groups as a unique group (13qBiallelic).

## References

- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. & Croce, C.M. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 15524–15529.
- Chena, C., Avalos, J.S., Bezars, R.F., Arrossagaray, G., Turdo, K., Bistmans, A. & Slavutsky, I. (2008) Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: Cytogenetic, FISH and clinical studies. *European Journal of Haematology*, **81**, 94–99.
- Dal Bo, M., Rossi, F.M., Rossi, D., Deambroggi, C., Bertoni, F., Del Giudice, I., Palumbo, G., Nanni, M., Rinaldi, A., Kwee, I., Tissino, E., Corradini, G., Gozzetti, A., Cencini, E., Ladetto, M., Coletta, A.M., Luciano, F., Bulian, P., Pozzato, G., Laurenti, L., Forconi, F., Di Raimondo, F., Marasca, R., Del Poeta, G., Gaidano, G., Foa, R., Guarini, A. & Gattei, V. (2011) 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **50**, 633–643.
- Delgado, J., Aventin, A., Briones, J., Sanchez, J., Nomdedeu, J. & Sierra, J. (2010) The use of tetradecanoylphorbol acetate-stimulated peripheral blood cells enhances the prognostic value of interphase fluorescence in situ hybridization in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **49**, 327–332.
- Dewald, G.W., Brockman, S.R., Paternoster, S.F., Bone, N.D., O'Fallon, J.R., Allmer, C., James, C.D., Jelinek, D.F., Tschumper, R.C., Hanson, C.A., Pruthi, R.K., Witzig, T.E., Call, T.G. & Kay, N.E. (2003) Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: Correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, **121**, 287–295.
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M. & Lichter, P. (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **343**, 1910–1916.
- Garg, R., Wierda, W., Ferrajoli, A., Abruzzo, L., Pierce, S., Lerner, S., Keating, M. & O'Brien, S. (2012) The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, **118**, 3531–3537.
- Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H., Hillmen, P., Keating, M.J., Montserrat, E., Rai, K.R. & Kipps, T.J. & International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. (2008) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the international workshop on chronic lymphocytic leukemia updating the national cancer institute-working group 1996 guidelines. *Blood*, **111**, 5446–5456.
- Hernandez, J.A., Rodriguez, A.E., Gonzalez, M., Benito, R., Fontanillo, C., Sandoval, V., Romero, M., Martin-Nunez, G., de Coca, A.G., Fisac, R., Galende, J., Recio, I., Ortuno, F., Garcia, J.L., de las Rivas, J., Gutierrez, N.C., San Miguel, J.F. & Hernandez, J.M. (2009) A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica*, **94**, 364–371.
- Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G. & Dalla-Favera, R. (2010) The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*, **17**, 28–40.
- Mertens, D., Wolf, S., Tschuch, C., Mund, C., Kienle, D., Ohl, S., Schroeter, P., Lyko, F., Dohner, H., Stilgenbauer, S. & Lichter, P. (2006) Allelic silencing at the tumor-suppressor locus 13q14.3 suggests an epigenetic tumor-suppressor mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 7741–7746.
- Mian, M., Rinaldi, A., Mensah, A.A., Rossi, D., Ladetto, M., Forconi, F., Marasca, R., Gattei, V., Zucca, E., Cavalli, F., Gaidano, G., Kwee, I. & Bertoni, F. (2012) Del(13q14.3) length matters: An integrated analysis of genomic, fluorescence in situ hybridization and clinical data in 169 chronic lymphocytic leukaemia patients with 13q deletion alone or a normal karyotype. *Hematological Oncology*, **30**, 46–49.
- Mosca, L., Fabris, S., Lionetti, M., Todoerti, K., Agnelli, L., Morabito, F., Cutrona, G., Andronache, A., Matis, S., Ferrari, F., Gentile, M., Spriano, M., Callea, V., Festini, G., Molica, S., Deliliers, G.L., Biciato, S., Ferrarini, M. & Neri, A. (2010) Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **16**, 5641–5653.
- Müller-Hermelink, H.K., Montserrat, E., Catovsky, D., Campo, E., Harris, N.L. & Stein, H. (2008) Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (eds. by S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S. Pileri, H. Stein, J. Thiele, J.W. Vardiman), pp. 180–182. IARC, Lyon.
- Orlandi, E.M., Bernasconi, P., Pascutto, C., Giardini, I., Cavigliano, P.M., Boni, M., Zibellini, S. & Cazzola, M. (2012) Chronic lymphocytic leukemia with del13q14 as the sole abnormality: Dynamic prognostic estimate by interphase-FISH. *Hematological Oncology*, doi:10.1002/hon.2032
- Ouillette, P., Erba, H., Kujawski, L., Kaminski, M., Shedden, K. & Malek, S.N. (2008) Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Research*, **68**, 1012–1021.
- Ouillette, P., Collins, R., Shakhani, S., Li, J., Li, C., Shedden, K. & Malek, S.N. (2011) The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **17**, 6778–6790.
- Parker, H., Rose-Zerilli, M.J., Parker, A., Chaplin, T., Wade, R., Gardiner, A., Griffiths, M., Collins, A., Young, B.D., Oscier, D.G. & Strefford, J.C. (2011) 13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, **25**, 489–497.
- Reddy, K.S. (2006) Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *British Journal of Haematology*, **132**, 705–722.
- Rodriguez, A.E., Hernandez, J.A., Benito, R., Gutierrez, N.C., Garcia, J.L., Hernandez-Sanchez, M., Risueno, A., Sarasquete, M.E., Ferminan, E., Fisac, R., de Coca, A.G., Martin-Nunez, G., de Las Heras, N., Recio, I., Gutierrez, O., De Las Rivas, J., Gonzalez, M. & Hernandez-Rivas, J.M. (2012) Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia patients with a high number of losses in 13q14. *PLoS One*, **7**, e48485.
- Sampath, D., Liu, C., Vasan, K., Sulda, M., Puduvalli, V.K., Wierda, W.G. & Keating, M.J. (2012) Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **119**, 1162–1172.
- Scrucca, L., Santucci, A. & Aversa, F. (2007) Competing risk analysis using R: An easy guide for clinicians. *Bone Marrow Transplantation*, **40**, 381–387.
- Scrucca, L., Santucci, A. & Aversa, F. (2010) Regression modeling of competing risk using R: An in depth guide for clinicians. *Bone Marrow Transplantation*, **45**, 1388–1395.
- Van Dyke, D.L., Shanafelt, T.D., Call, T.G., Zent, C.S., Smoley, S.A., Rabe, K.G., Schwager, S.M., Sonbert, J.C., Slager, S.L. & Kay, N.E. (2010) A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, **148**, 544–550.



**Table S1.** Baseline characteristics of patients at diagnosis, combining 13q<sub>x2</sub> and 13q<sub>M</sub> groups as a unique group (13q<sub>Biallelic</sub>)

Patients characteristics	del(13q <sub>x1</sub> ) (N=515)	13q <sub>Biallelic</sub> (N=112)	P-value
Median age at diagnosis (range)	66 (28-92)	67 (43-90)	0.865
Male	314 (61%)	63 (56.3%)	0.395
Binetstage (N=616)			
A	454 (89.4%)	96 (88.9%)	0.903
B	38 (7.5%)	8 (7.4%)	
C	16 (3.1%)	4 (3.7%)	
Absolute white blood cell count (x10 <sup>9</sup> /l)	18.5 (2.9-357)	20.4 (3.8-150)	0.160
Absolut lymphocyte count (x10 <sup>9</sup> /l)	12.9 (1.9-287)	14.0 (1.8-114.9)	0.182
Hemoglobin (g/l)	140 (64-180)	140 (60-180)	0.177
Platelets (x10 <sup>9</sup> /l)	196 (40-560)	198 (74-470)	0.427
Lactate dehydrogenase (IU/l)	314 (81-1420)	323 (103-658)	0.985
Beta-2 Microglobulin (mg/l)	2.0 (0.6-17.4)	2.1 (1-6.7)	0.478
Adenopathies (n=512)	124 (29.5%)	23 (25.0%)	0.710
Splenomegaly (n=615)	43 (8.5%)	6 (5.5%)	0.336
Hepatomegaly (n=425)	25 (4.9%)	5 (4.5%)	0.549
ZAP-70 positive (n=278)*	67/223 (30%)	10/55 (18.2%)	0.093
CD38 positive (n=418)*	57/345 (16.5%)	10/73 (13.7%)	0.725
Unmutated <i>IGHV</i> (n=148)	29/124 (23.4%)	5/24 (20.8%)	1.000
Conventional cytogenetics (n=313)			
Abnormal karyotype	67/251 (26.7%)	20/62 (32.2%)	0.429
Additional abnormalities to del(13q)	43/251 (17.1%)	17/62 (27.4%)	0.073
Median follow-up (months)	52 (0-250)	45 (0-250)	0.822

\* Positivity was considered when ZAP-70>20% and CD38>30%.





# Resultats Annexos

## Article 1

Taula S1. Cariotips dels pacients amb resultat alterat a l'estudi de citogenètica convencional de bandes G realitzat (N=87).

ID	Cariotip	Tipus de pacient	% nuclis del(13q)
1	46,XY,t(6;13;16)(p12;q13;q24)[4]/46,XY[22]	13qx1	17%
2	46,XY,t(4;13)(q31;q32),t(18;22)(q21;q11)[6]/46,XY[14]	13qx1	22%
3	46,XY,del(6)(q21)[1]/46,XY[29]*	13qx1	13%
4	42,XX,der(9)t(9;21)(q34;p11),-10,der(11)t(10;11)(q11;p12),-12,-19,-21[5]/46,XX[6]	13qx1	35%
5	46,XY,t(2;7)(q21;q22)[6]/46,XY[11]	13qx2	40%
6	46,XX,inv(1)(p22q44)[1]/46,XX[19]*	13qM	88%
7	46,XY,del(6)(q22q23),del(13)(q14q21)[3]/46,XY[17]	13qM	32%
8	46,XY,del(13)(q14),add(16)(q24)[16]/46,XY[4]	13qx1	79%
9	46,XY,del(13)(q14)[2]/46,XY[15]	13qx1	26%
10	45,XY,-13,der(20)t(13;20)(q14;p13)[14]/46,XY[6]	13qx1	88%
11	46,XY,add(1)(q23),del(2)(p13p23),add(13)(q34)[3]/46,XY,add(1)(q23),del(2)(p13p23),add(13)(q34),add(14)(q32)[3]/46,XY[17]	13qx1	52%
12	46,XY,del(13)(q34)[17]/46,XY[4]	13qx1	65%
13	46,XY,t(13;22)(q14;q11)[30]/46,XY[5]	13qx1	96%
14	44-45,X,-Y,+1,der(1)del(1)(p21p36),der(1)del(1)(q22),del(4)(p21),del(6)(q16),add(6)(q21),der(7)t(1;7)del(7)(q31),add(11)(p15),del(11)(q22q23),add(12)(q23),-14,add(16)(q23),+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5[cp9]/46,XY[10]	13qM	27%
15	46,XX,del(6)(q23q25)[3]/46,XX[14]	13qM	88%
16	46,XY,del(13)(q14q32)[14]/46,XY[1]	13qM	79%
17	46-47,XX,der(5),del(6)(q21q26),der(7)add(7)(p22),del(11)(q22q23),+mar[cp20]	13qx1	85%
18	46,XX,del(13)(q12q14)[4]/46,XX,del(13)(q12q14),del(22)(q12)[2]/46,XX[14]	13qx1	79%
19	46,XY,del(13)(q14q21)[6]/46,XY[39]	13qx1	10%
20	46,XX,t(11;13)(p15;q14)[1]/46,XX[19]*	13qx1	80%
21	46,XY,del(18)(p12)[8]/46,XY[16]	13qx1	14%
22	46,XY,t(13;17)(q14;p12)[14]/46,XY[20]	13qx1	36%
23	46,XX,t(2;18)(p11;q21)[10]/46,XX[10]	13qx1	66%
24	46,Y,t(X;13)(p?11;q14)[6]/47,XY,+12[3]/46,XY[11]	13qx1	75%
25	46,XY,t(1;13)(q?;q14?),del(13)(q14q21)[16]	13qx1	80%
26	46,XX,t(1;9)(p34;q13),t(2;3)(q12;q26),add(14)(q32)[6]/46,XX[14]	13qx1	43%
27	45,XX,-9[8]/46,XX[12]	13qx2	55%

ID	Cariotip	Tipus de pacient	% nuclis del(13q)
28	46,XX,del(13)(q14)[2]/46,XX,del(16)(q22q24)[8]/46,XX[10]	13qx1	26%
29	46,XY,dup(1)(q12)[9]/46,XY,dup(1)(q12),t(11;14)(q25;q13)[2]	13qx1	52%
30	46,XX,del(11)(q24)[3]/47,XX,+8,del(11)(q24)[2]/46,XX[15]	13qx1	31%
31	46,XX,t(3;11)(q13;q23)[3]/46,XX[28]	13qM	80%
32	46,XX,del(13)(q14)[3]/46,XX[19]	13qx1	69%
33	46,XY,del(7)(qter)[4]/46,XY[16]	13qx1	65%
34	46,XY,del(10)(q22q24)[4]/46,XY[4]	13qx1	85%
35	45,XX,add(1)(p36),-13,add(17)(p13),-20,+mar[8]/46,XX[32]	13qx1	10%
36	46,XY,add(15)(q26)[5]/46,XY[13]	13qx1	76%
37	46,XY,del(13)(q13)[10]	13qx1	65%
38	46,XX,del(20)(p12)[3]/46,XX[13]	13qx1	71%
39	46,XX,del(15)(q22)[4]/46,XX,del(15)(q22),del(18)(p11)[2]/46,XX[14]	13qx1	29%
40	46,XY,del(13)(q14)[7]/46,XY[8]	13qx1	43%
41	45,XY,-21[3]/46,XY[37]	13qx1	36%
42	46,XX,del(13)(q14)[3]/46,XX[17]	13qx1	76%
43	47,XX,+22[2]/46,XX[18]	13qx1	74%
44	46,XY,del(13)(q14q22)[2]/46,XY[18]	13qM	87%
45	46,XY,del(13)(q14)[5]/46,XY[15]	13qx1	54%
46	46,XY,del(13)(q14)[2]/46,XY[18]	13qx1	35%
47	46,XY,t(14;18)(q32;q21)[7]/46,XY,t(2;3)(p11;q11),t(14;18)(q31;q21)[1]/46,XY[12]*	13qx1	17%
48	46,XY,der(4),add(18)(p11)[4]/46,XY[16]	13qx1	12%
49	46,XY,t(3;13)(q27;q14)[1]/46,XY[39]*	13qM	80%
50	46,XX,del(13)(q14)[6]/46,XX[5]	13qx1	50%
51	46,XY,t(1;13)(p34;q14),del(16)(p13)[13]/46,XY[7]	13qx1	75%
52	46,XY,del(13)(q14)[2]/46,XY[16]	13qx1	50%
53	46,XX,del(13)(q14)[13]/46,XX[7]	13qx1	60%
54	46,XX,del(13)(q14)[2]/46,XX[18]	13qx1	36%
55	46,XY,der(11)add(11)(p15)t(5;11)(q31;q23),del(11)(q21q23?)[4]/46,XY[35]	13qx1	18%
56	46,XY,del(13)(q14)[4]/46,XY,del(11)(q?) [2]/46,XY[9]	13qx1	87%
57	46,XY,del(13)(q14)[2]/46,XY[16]	13qx1	61%
58	45,X,-X[4]/48,XX,+4,+18[2]/46,XX[14]	13qM	44%
59	46,XY,del(13)(q14)[1]/47,XY,del(13)(q14),+20[2]/46,XY[4]	13qx1	65%
60	46,XY,del(6)(q21)[2]/46,XY[18]	13qx1	77%
61	46,XY,t(2;13)(q24;q23)[7]/46,XY[18]	13qx1	79%

ID	Cariotip	Tipus de pacient	% nuclis del(13q)
62	46,XY,del(13)(q14)[6]/46,XY[6]	13qx1	85%
63	45,X,-X[6]/46,XX[14]	13qx1	14%
64	46,XY,t(14;22)(q32;q11)[6]/46,XY[20]	13qx1	69%
65	46,XX,del(13)(q14)[3]/46,XX[12]	13qx1	60%
66	46,XY,del(13)(q14)[2]/46,XY[18]	13qx1	75%
67	46,XX,del(10)(q22q24),-13,-14,+mar1,+mar2[4]/46,XX[16]	13qx1	23%
68	46,XY,t(13;15)(q14;q24)[5]/46,XY[15]	13qx1	80%
69	46,XY,del(6)(q21q27)[5]/46,XY[14]	13qx1	50%
70	46,XX,t(14;19)(q32;q13)[6]/46,XX[10]	13qx1	80%
71	46,XX,del(13)(q13)[5]/46,XX[7]	13qx1	60%
72	46,XY,del(13)(q14q21)[9]/46,XY[10]	13qx1	69%
73	46,XX,del(13)(q14)[2]/46,XX[18]	13qx1	22%
74	46,XY,del(13)(q13q31)[1]/46,XY[19]	13qx1	34%
75	46,XY,del(6)(q13q26)[6]/46,XY[14]	13qx2	19%
76	46,XX,der(12)t(12;13)(q15;q14),der(13)del(13)(q12q143)t(12;13)(q15;q14)[4]/46,XX[16]	13qx2	78%
77	46,XY,del(13)(q14q32),add(20)(q13)[25]/46,XY[5]	13qM	87%
78	46,XX,t(2;13)(q36;q14)[8]/46,XX[12]	13qM	78%
79	46,XX,t(6;13)(q15;q14),add(22)(q13)[6]/46,XX[10]	13qM	88%
80	46,XY,del(13)(q14)[4]/46,XY[16]	13qx1	90%
81	46,XY,del(13)(q14)[17]/46,XY[3]	13qx1	90%
82	46,XY,t(2;13)(q35;q14)[19]/46,XY[1]	13qx2	82%
83	46,XY,t(3;13)(q13;q14)[6]/46,XY[14]	13qM	93%
84	46,XY,del(13)(q12q14)[2]/46,XY[18]	13qM	95%
85	46,XY,del(7)(q31q32),t(10;13)(q11.2;q13),del(13)(q13q22)[cp12]/46,XY[8]	13qM	100%
86	46,XX,del(13)(q14q31)[13]/46,XX[7]	13qx1	91%
87	46,XY,i(8)(q10)[8]/46,XY[12]	13qx1	94%

\*Alteracions identificades en una única metafase, però clonalitat confirmada per FISH o en altres estudis citogenètics realitzats al pacient.

13qx1: deleció monoal·lèlica de 13q14; 13qx2: deleció bial·lèlica de 13q14; 13qM: pacient amb mosaic de cèl·lules amb deleció monoal·lèlica i bial·lèlica de 13q14







## Article 2

*Interstitial 13q14 deletions detected in the karyotype and translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia (CLL): Different genetic mechanisms but equivalent poorer clinical outcome*

## Interstitial 13q14 deletions detected in the karyotype and translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia (CLL): Different genetic mechanisms but equivalent poorer clinical outcome

Anna Puiggros<sup>1,2</sup>, Marta Venturas<sup>1</sup>, Marta Salido<sup>1,2</sup>, Gonzalo Blanco<sup>1,2,3</sup>, Concepción Fernandez-Rodriguez<sup>4</sup>, Rosa Collado<sup>5</sup>, Alberto Valiente<sup>6</sup>, Neus Ruiz-Xivillé<sup>7</sup>, Ana Carrió<sup>8</sup>, Francisco José Ortuño<sup>9</sup>, Elisa Luño<sup>10</sup>, María José Calasanz<sup>11</sup>, María Teresa Ardanaz<sup>12</sup>, María Ángeles Piñán<sup>13</sup>, Elisabet Talavera<sup>14</sup>, María Teresa González<sup>15</sup>, Margarita Ortega<sup>16</sup>, Isabel Marugán<sup>17</sup>, Ana Ferrer<sup>1,2</sup>, Eva Gimeno<sup>4,18</sup>, Beatriz Bellosillo<sup>4,19</sup>, Julio Delgado<sup>8</sup>, José Ángel Hernández<sup>20</sup>, Jesús María Hernández-Rivas<sup>21</sup>, Blanca Espinet<sup>1,2</sup>, en representació del *Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica* (GCECGH) i del *Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica* (GELLC).

<sup>1</sup>Laboratori de Citogenètica Molecular, Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona; <sup>2</sup>Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques, Programa de recerca en càncer, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona; <sup>3</sup>Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, E-08003 Barcelona; <sup>4</sup>Grup de Recerca Clínica Aplicada en Neoplàsies Hematològiques, Programa de recerca en càncer, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona; <sup>5</sup>Servicio de Hematología, Consorcio Hospital General Universitario, Valencia; <sup>6</sup>Servicios de Genética y Hematología, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona; <sup>7</sup>Servei d'Hematologia, Institut Català d'Oncologia-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, IJC, Badalona; <sup>8</sup>Secció d'Hematopatologia, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona; <sup>9</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia; <sup>10</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo; <sup>11</sup>Servicio de Citogenética, Departamento de Genética, Universidad de Navarra, Pamplona; <sup>12</sup>Servicio de Hematología, Hospital Txagorritxu, Vitoria; <sup>13</sup>Servicio de Hematología, Hospital de Cruces, Bilbao; <sup>14</sup>Unitat Citogenètica Laboratori Clínic ICS Lleida, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida; <sup>15</sup>Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela; <sup>16</sup>Laboratorio de Citogenética y Servicio de Hematología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona; <sup>17</sup>Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Clínico Universitario, Valencia; <sup>18</sup>Servei d'Hematologia, Hospital del Mar, Barcelona; <sup>19</sup>Laboratori de Biologia Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona; <sup>20</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid; <sup>21</sup>Servicio de Hematología, Hospital

Universitario de Salamanca, IBSAL, IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, CSIC, Salamanca, Spain.

La deleció de 13q14 [del(13q)] és un marcador de bon pronòstic quan es detecta com a única alteració en la leucèmia limfàtica crònica (LLC). No obstant, el valor pronòstic de les translocacions que afecten la citobanda 13q14 [t(13q)] i tenen una deleció de 13q associada no s'ha establert. L'objectiu d'aquest treball va ser definir l'impacte clínic que té la detecció d'alteracions de 13q14 per citogenètica convencional amb bandes G (CC). Es van analitzar les característiques clínic-biològiques de tres grups de pacients amb LLC establerts en funció del tipus d'anomalia de 13q que presentaven. Dos d'ells mostraven alteracions de la regió 13q14 per CC: el grup t(13q) incloïa 25 pacients amb alguna translocació de la regió 13q14, mentre el grup i-del(13q) estava format per 62 malalts amb deleció intersticial de 13q detectada al cariotip. El tercer grup analitzat, F-del(13q), estava format per 295 pacients amb del(13q) identificada per hibridació in situ fluorescent (FISH), però que no presentaven cap alteració a la regió 13q14 al cariotip.

Per a tots ells es van estudiar les sondes de FISH incloses al panell de rutina en LLC (D13S319, CEP12, *ATM*, *TP53*); a més a més, es van analitzar les delecions del gen *RB1* en tots els pacients amb t(13q) i en un grup representatiu dels i-del(13q) i F-del(13q). També es van analitzar les mutacions dels gens *NOTCH1*, *SF3B1* i *MYD88* als casos t(13q) per seqüenciació de Sanger. En total es van identificar 25 t(13q) diferents; totes mostraven deleció de D13S319, però només un 32% (8/25) també presentava pèrdua de *RB1*. La mediana del percentatge de nuclis amb pèrdua de 13q del grup t(13q) no diferia de la dels pacients amb i-del(13q) (73% vs. 64%), però ambdós medianes eren significativament superiors que la del grup F-del(13q) (52%,  $P < 0,001$ ). A més, els pacients amb t(13q) mostraven una incidència major de del(13q) bial·lèliques (52% vs. 11,3% i 14,9%,  $P < 0,001$ ) i una taxa de deleció 17p concomitant superior (37,5% vs. 8,6% i 7,2%,  $P < 0,001$ ). La taxa d'inclusió de *RB1* en la deleció era significativament més alta al grup i-del(13q) (79%,  $P < 0,001$ ). Dos pacients t(13q) presentaven mutació de *NOTCH1* (11,8%). El temps fins al primer tractament dels pacients t(13q) i i-del(13q) era significativament més curt que el del grup F-del(13q) (67, 44 i 137 mesos,  $P = 0,029$ ), diferència que preservava la seva significança estadística en l'anàlisi multivariada. En conclusió, els pacients amb t(13q) o del(13q) detectada al cariotip formen part d'un subgrup de pacients amb pèrdua de 13q14 que s'associa a un pitjor curs clínic.

# Interstitial 13q14 Deletions Detected in the Karyotype and Translocations with Concomitant Deletion at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia: Different Genetic Mechanisms but Equivalent Poorer Clinical Outcome

Anna Puiggros,<sup>1,2</sup> Marta Venturas,<sup>1</sup> Marta Salido,<sup>1,2</sup> Gonzalo Blanco,<sup>1,2,3</sup> Concepción Fernandez-Rodriguez,<sup>4</sup> Rosa Collado,<sup>5</sup> Alberto Valiente,<sup>6</sup> Neus Ruiz-Xivillé,<sup>7</sup> Ana Carrió,<sup>8</sup> Francisco José Ortuño,<sup>9</sup> Elisa Luño,<sup>10</sup> María José Calasanz,<sup>11</sup> María Teresa Ardanaz,<sup>12</sup> María Angeles Piñán,<sup>13</sup> Elisabet Talavera,<sup>14</sup> María Teresa González,<sup>15</sup> Margarita Ortega,<sup>16</sup> Isabel Marugán,<sup>17</sup> Ana Ferrer,<sup>1,2</sup> Eva Gimeno,<sup>4,18</sup> Beatriz Bellosillo,<sup>4,19</sup> Julio Delgado,<sup>9</sup> José Angel Hernández,<sup>20</sup> Jesús María Hernández-Rivas,<sup>21</sup> and Blanca Espinet,<sup>1,2,\*</sup> on behalf of Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH) and Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC)

<sup>1</sup>Laboratori de Citogenètica Molecular, Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques, Cancer Res Program, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, E-08003, Spain

<sup>4</sup>Grup de Recerca Clínica Aplicada en Neoplàsies Hematològiques, Cancer Res Program, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Servicio de Hematología, Consorcio Hospital General Universitario, Valencia, Spain

<sup>6</sup>Servicios de Genética y Hematología, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Spain

<sup>7</sup>Servei d'Hematologia, Institut Català d'Oncologia-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, IJC, Badalona, Spain

<sup>8</sup>Secció d'Hematopatologia, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>9</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia, Spain

<sup>10</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>11</sup>Servicio de Citogenética, Departamento de Genética, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

<sup>12</sup>Servicio de Hematología, Hospital Txagorritxu, Vitoria, Spain

<sup>13</sup>Servicio de Hematología, Hospital de Cruces, Bilbao, Spain

<sup>14</sup>Unitat Citogenètica Laboratori Clínic ICS Lleida, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

<sup>15</sup>Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Spain

<sup>16</sup>Laboratorio de Citogenética y Servicio de Hematología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>17</sup>Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>18</sup>Servei d'Hematologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

<sup>19</sup>Laboratori de Biologia Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

<sup>20</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid, Spain

<sup>21</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, CSIC, Salamanca, Spain

Deletion of 13q14 as the sole abnormality is a good prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Nonetheless, the prognostic value of reciprocal 13q14 translocations [t(13q)] with related 13q losses has not been fully elucidated. We described clinical and biological characteristics of 25 CLL patients with t(13q), and compared with 62 patients carrying interstitial del(13q) by conventional G-banding cytogenetics (CGC) [i-del(13q)] and 295 patients with del(13q) only detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) [F-del(13q)]. Besides from the CLL FISH panel (D13S319, CEP12,

Supported by: Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Grant number: PI11/01621; Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Grant numbers: RD09/0076/00036, RD12/0036/0044, and RD12/0036/0069; Generalitat de Catalunya and "Xarxa de Bancs de tumors" [Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC)], FEDER, Grant number: 2009/SGR541; LaCaixa Foundation (G.B.).

\*Correspondence to: Blanca Espinet, Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del

Mar, Pg. Marítim, 25-29. 08003, Barcelona, Spain. E-mail: bespinet@parcdesalutmar.cat

Received 5 February 2014; Revised 22 May 2014; Accepted 23 May 2014

DOI 10.1002/gcc.22188

Published online 10 June 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

*ATM*, *TP53*), we studied *RBI* deletions in all t(13q) cases and a representative group of i-del(13q) and F-del(13q). We analyzed *NOTCH1*, *SF3B1*, and *MYD88* mutations in t(13q) cases by Sanger sequencing. In all, 25 distinct t(13q) were described. All these cases showed D13S319 deletion while 32% also lost *RBI*. The median percentage of 13q-deleted nuclei did not differ from i-del(13q) patients (73% vs. 64%), but both were significantly higher than F-del(13q) (52%,  $P < 0.001$ ). Moreover, t(13q) patients showed an increased incidence of biallelic del(13q) (52% vs. 11.3% and 14.9%,  $P < 0.001$ ) and higher rates of concomitant 17p deletion (37.5% vs. 8.6% and 7.2%,  $P < 0.001$ ). *RBI* involvement was significantly higher in the i-del(13q) group (79%,  $P < 0.001$ ). Two t(13q) patients (11.8%) carried *NOTCH1* mutations. Time to first treatment in t(13q) and i-del(13q) was shorter than F-del(13q) (67, 44, and 137 months,  $P = 0.029$ ), and preserved significance in the multivariate analysis. In conclusion, t(13q) and del(13q) patients detected by CGC constitute a subgroup within the 13q-deleted CLL patients associated with a worse clinical outcome. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

## INTRODUCTION

Chromosomal abnormalities identified by interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) are known prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Among them, 13q14 deletion [del(13q)], which is detected in more than 50% of cases, has been related to good prognosis when detected as a sole abnormality by FISH (Dohner et al., 2000). However, several studies have proven that patients harboring 13q14 deletion are a heterogeneous group. Those patients with larger deletions including the *RBI* gene, as well as those carrying a higher percentage of altered nuclei by FISH have a significantly poorer clinical outcome (Ouilllette et al., 2008, 2011; Hernandez et al., 2009; Mosca et al., 2010; Van Dyke et al., 2010; Dal Bo et al., 2011; Mian et al., 2012; Orlandi et al., 2012). Although conventional G-banding cytogenetics (CGC) studies have been traditionally limited due to the low mitotic rate of CLL cells in culture, additional abnormalities identified in the karyotype can provide more accurate cytogenetic information which could refine the prognosis (Rigolin et al., 2012). Reciprocal translocations involving 13q14 [t(13q)] and many different chromosomes have been described (Gardiner et al., 1997; Struski et al., 2007; Hruba et al., 2012). The absence of a recurrent partner suggests that the consequence of these genomic rearrangements is probably the loss of a tumor suppressor gene in 13q14 rather than the generation of a fusion gene (Gardiner et al., 1997). Indeed, it has been reported that 10% of the del(13q) identified by FISH are associated with 13q14 rearrangements detectable by CGC (Hruba et al., 2012). To date, some authors have characterized the size of losses related to t(13q) by FISH (Gardiner et al., 1997; Struski et al., 2007; Hruba et al., 2012). However, the impact that these chromosomal rearrangements could have on the prognosis has not been fully elucidated.

Recently, next-generation sequencing techniques have allowed the identification of a few driver mutations directly related with survival and proliferation of malignant cells in CLL. Among them, *NOTCH1* and *SF3B1* mutations are detected in up to 10% of newly diagnosed CLL patients and correlate with adverse clinical features and poorer outcome. *MYD88* mutations are less frequently detected (below 10%) and their prognostic impact still remains elusive. These mutations have been suggested as early clonal events and have been more frequently detected in CLL patients with isolated 13q deletion (Puente et al., 2011; Quesada et al., 2011; Jeromin et al., 2013).

In the present study, we describe the frequency of deletions involving D13S319 and *RBI*, loci located at 13q14, in 25 patients with t(13q) detected by CGC. Mutations of *NOTCH1*, *SF3B1*, and *MYD88* genes were also analyzed. We assessed clinical and biological differences between patients carrying t(13q) and those harboring an interstitial del(13q) detected by CGC or del(13q) only detected by FISH analysis.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Patients with t(13q) were selected from a database of patients with CLL or monoclonal B cell lymphocytosis (MBL) from 25 Spanish Institutions. From 838 patients with CGC data available, a total of 350 abnormal karyotypes were identified. Among them, 27 carried translocations of 13q [t(13q)]. For the purpose of the study, only 25 patients with translocations involving 13q14 with available samples were included; 21 had been diagnosed as CLL and four were MBL. One patient was previously reported (Collado et al., 2006). Moreover, two additional groups of patients were selected for comparison of clinical and

biological data. The first group, i-del(13q), included 62 patients with an interstitial 13q14 deletion by CGC (50 CLL and 12 MBL). A second group, F-del(13q), was composed of 295 patients who lacked 13q abnormalities in the CGC study but carried del(13q) detected by FISH (213/295 with normal karyotype). A total of 234 of the latter were CLL and 71 MBL. Treatments were administered following standard criteria for therapy and response evaluation (Cheson et al., 1988, 1996; Hallek et al., 2008). Only 14 patients had received treatment prior to cytogenetic analysis. This study was performed in accordance with national and international guidelines (professional code of conduct, Declaration of Helsinki), and approved by the Ethical Committee of Hospital del Mar.

#### Conventional G-Banding Cytogenetics

Cytogenetic analyses were performed on samples cultured for 72 hr with TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) according to standard procedures. All patients with t(13q) were studied in peripheral blood (PB), while interstitial deletions of the control group were identified in 53 PB and nine bone marrow (BM) samples. Among F-del(13q) patients, 256 were studied in PB and 39 in BM. A minimum of 20 metaphases were analyzed. Karyotypes were described following the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013) (Shaffer et al., 2013).

#### Fluorescence In Situ Hybridization

FISH analyses were performed on fixed material from the same cultured sample of CGC. The FISH panel used in the routine follow-up of all the patients included specific probes for *TP53* (17p13), *ATM* (11q22), D13S319 (13q14) and the centromeric region of chromosome 12. A commercial probe for the *RBI* gene (Abbott Molecular, Abbot Park, IL) was used to characterize 13q deletions on fixed cells from the 25 patients with translocations of 13q. *RBI* status was also analyzed in all i-del(13q) patients who had available sample (34 cases) and in a randomly selected 35 F-del(13q) patients with fixed material available, as a representation of the whole F-del(13q) group. A minimum of 200 nuclei were evaluated.

#### DNA Sequencing

Genomic DNA from PB mononuclear cells or from CD19+ cells obtained from PB by means of

immunomagnetic bead selection (CD19 Microbeads, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) was available from 17 patients with t(13q). Sequences from exon 34 of the *NOTCH1* gene, *SF3B1* described hot spots (exon 14–16) and *MYD88* L265P regions were analyzed by Sanger sequencing according to standard procedures on a 3500DX analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

#### Statistical Analysis

Chi-square or Fisher exact tests were performed to compare discrete variables between patients with t(13q), i-del(13q) or F-del(13q), while comparisons of continuous variables were assessed by the Kruskal–Wallis test. Time to first treatment (TFT) was defined as the time from diagnosis to start of treatment or last follow-up, and overall survival (OS) was defined as the time from diagnosis to death or last follow-up. Both factors were evaluated using Kaplan–Meier plots. The effect of different covariates was evaluated using the log-rank test. Cox proportional hazards regression models were performed to assess the maintenance of their independent predictive value. Statistical analyses were performed using SPSS v.17 software (SPSS Inc, Chicago, IL), *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

#### Cytogenetic Abnormalities

From the global cohort of 838 CLL/MBL cases with CGC data, a total of 350 abnormal karyotypes (41.7%) were identified. For the purpose of this study, only 25 patients with translocations involving 13q14, 62 patients showing an interstitial 13q14 deletion [i-del(13q)] and 295 patients with 13q deletion confirmed by FISH but nonaltered chromosome 13 by CGC [F-del(13q)] were selected. Most of the selected patients with chromosome 13 abnormalities in the karyotype (56%) carried isolated t(13q) or i-del(13q) by CGC; one additional abnormality was found in 6/25 (24%) of t(13q) patients and 15/62 (24%) of i-del(13q) group. Only 5/25 (20%) and 12/62 (19%) patients carried complex karyotypes, respectively. A total of 213/295 (72%) F-del(13q) patients presented a normal karyotype by CGC, while 82/295 (28%) showed a wide range of abnormalities which did not include chromosome 13. Only 16/82 (19.5%) F-del(13q) patients with cytogenetic abnormalities carried complex karyotypes. No significant

differences in the number of abnormalities among groups were found.

With regard to 13q14 translocations, 25 different rearrangements were identified (Table 1). The most frequent chromosome partners were 2, 3, 6, 11, 17, and 22. However, none of the donor chromosome breakpoints involved in translocations with 13q14 was recurrent. Complex translocations involving three chromosomes were identified in two patients (Table 1). Only one of them had a complex karyotype and, interestingly, both carried a concomitant *TP53* loss.

Deletion of the D13S319 locus was confirmed by FISH in all t(13q) patients with a median number of deleted nuclei of 73% (range:13–95%). Among them, 14 carried monoallelic deletions while 11 carried biallelic losses. Seven of the latter were mosaic for two independent clones harboring both monoallelic and biallelic deletions. Concerning 13q deletions identified in all the patients of the remaining groups, the median number of deleted nuclei in i-del(13q) patients was 65%, not significantly different from the t(13q) group. However, F-del(13q) patients showed a median number of deleted nuclei of 52%, which was significantly lower than in the other groups ( $P < 0.001$ ). The percentage of patients who carried biallelic losses was significantly higher in the t(13q) group (52% vs. 11.3% i-del(13q) and 14.9% F-del(13q),  $P < 0.001$ ).

Regarding the remaining abnormalities studied in the routine FISH panel in CLL, all groups had similar frequencies of concomitant 11q deletion (12%, 12.3%, and 9.2%, respectively) and trisomy 12 (4%, 10%, and 9.5%, respectively). However, the detection rate of 17p deletion in patients with t(13q) was significantly higher than in patients with i-del(13q) and F-del(13q) (37.5% vs. 8.6% and 7.2%, respectively,  $P < 0.001$ ).

#### ***RBI* Involvement in 13q Deletion**

Only 8/25 (32%) patients with t(13q) showed a loss of the *RBI* gene in the 13q deletion. All of them carried monoallelic *RBI* losses, and in one case, coexistence with a concomitant clone with biallelic deletion was identified. Percentages of nuclei with *RBI* deletion were in accordance with those observed in the D13S319 hybridization in most of the patients. Nonetheless, three patients showed *RBI* loss in nearly half of the 13q-deleted nuclei (Table 1). When *RBI* was assessed in a representative number of i-del(13q) and F-del(13q) patients with fixed material available, similar rates

of *RBI* deletion were found in the F-del(13q) group (11/35, 31%). However, i-del(13q) showed a significant overrepresentation of *RBI*-deleted cases, being identified in 27/34 analyzed cases (79%,  $P < 0.001$ ).

#### **Mutational Status of *NOTCH1*, *SF3B1*, and *MYD88* in t(13q) Patients**

Mutational analysis of the *NOTCH1*, *SF3B1*, and *MYD88* genes was performed in 17 t(13q) patients. Among them, two cases carried a recurrent frame-shift deletion in *NOTCH1* (c.7544\_7545delCT). No other additional mutation of *SF3B1* or *MYD88* was identified in the studied cohort. Both patients with altered *NOTCH1* were diagnosed of CLL at Binet stage A and progressed, requiring treatment after 45 and 11 months, respectively. Cytogenetic features from those cases were quite different: while one case carried an isolated 13q translocation, the other showed a complex karyotype with multiple abnormalities by FISH (patients 22 and 25, Table 1). Indeed, only the latter died from disease progression after a follow-up of 38 months.

#### **Clinical and Biological Characteristics**

Regarding clinical and biological features at diagnosis of t(13q), i-del(13q) and F-del(13q) patients, most patients had an asymptomatic disease diagnosed at an early stage, 22.5% (86/382) were MBL and 68.1% (260/382) CLL Binet A. Moreover, apart from a decreased proportion of ZAP-70 positive cases in F-del(13q) group, no other significant differences in the baseline clinical and biological characteristics among groups were found (Table 2). Data concerning *IGHV* mutational status from the studied patients were not available.

Concerning the outcome, nearly one-third of the studied patients required treatment during follow-up. Interestingly, significant differences in the proportion of treated patients and the median TFT were found among groups. The proportion of treated patients in the F-del(13q) group (25.1%) was significantly lower than in the t(13q) (52%) and i-del(13q) groups (56%,  $P < 0.001$ ). Moreover, although no differences were found between TFT of t(13q) and i-del(13q) patients (67 and 44 months, respectively), longer TFT was observed in F-del(13q) group (137 months,  $P = 0.029$ ; Table 2 and Fig. 1A). Significant differences in the TFT were also found when t(13q) and i-del(13q) were considered as a sole group (Table 3 and Fig. 1B).



TABLE 1. Karyotype and Abnormalities Detected by FISH in Patients with t(13q)

Id	Karyotype	13q: D13S319		13q: RB1		Trisomy 12		11q22-q23		17p13	
		State	%	State	%	State	%	State	%	State	%
1 <sup>a</sup>	44,XY,der(11)t(11;2)(q12;q12),del(13)(q11)-16,der(17)t(16;17)(q12;p11)-21,der(22)(13qter→13q14::11q13→11q22::22p12→22qter)[22]/46,XY[5]	MD	94	N	-	N	-	MD	93	MD	96
2	46,XX,t(6;6)(p25;p21),t(8;13)(p12;q14)[8]/46,XX,del(6)(q15q23)[2]/46,XX[10]	MD	34	MD	33	N	-	N	-	N	-
3	46,XY,t(2;13)(q35;q14)[19]/46,XY[1]	BD	93	N	-	N	-	N	-	N	-
4	46,XY,t(6;13)(p22;q14)[7]/46,XY[16]	MD	86	N	-	N	-	N	-	N	-
5	46,XY,t(11;13)(q25;q14)[1]/46,idem,t(17)(q10)[1]/46,XY[8]	MD+BD	61 / 16	MD+BD	62 / 14	N	-	MD	80	MD	85
6	46,XY,t(4;13)(q31;q14),t(18;22)(q21;q11)[6]/46,XY[14]	MD	35	MD	36	N	-	N	-	N	-
7	46,XX,t(2;13)(q36;q14)[8]/46,XX[12]	MD+BD	56 / 15	N	-	N	-	N	-	N	-
8	46,XX,t(5;13)(q34;q14),inv(9)(p11q12)c[2]/46,XX,inv(9)(p11q12)c [17]	MD+BD	9 / 57	MD	28	N	-	N	-	N	-
9	45,XY,-13,der(20)t(13;20)(q14;p13)[14]/46,XY[6]	MD	87	MD	80	N	-	N	-	N	-
10	46,XY,t(2;13)(q24;q14)[7]/46,XY[18]	MD	61	MD	21	N	-	N	-	N	-
11	46,XY,t(13;13)(q14;q22)[4]/46,idem,t(10;14)(q22;q24)[16]/46,XY[2]	BD	95	N	-	N	-	N	-	MD	10
12	46,XY,t(13;15)(q14;q24)[5]/46,XY[15]	MD	80	N	-	N	-	N	-	N	-
13	46,XY,t(3;13)(q13;q14)[6]/46,XY[14]	MD	83 / 9	N	-	N	-	N	-	N	-
14	46,XX,der(12)t(12;13)(q15;q14),der(13)del(13)(q12q14)t(12;13)(q15;q14)[47]/46,XX[16]	BD	77	N	-	N	-	N	-	N	-
15	46,XY,t(10;13)(p13;q13-14)[2]/46,XY,del(17)(p13)[2]/46,XY[15]	MD	67	MD	13	N	-	N	-	MD	11
16	46,XY,t(3;13)(q27;q14)[1]/46,XY[39]	MD+BD	19 / 61	N	-	N	-	N	-	N	-
17	46,XY,t(13;17)(q21;p13)[17]/46,XY[23]	MD	30	N	-	N	-	N	-	MD	35
18	46,X,Yqh-c,t(1;13)(q42;q13)[38]/46,X,Yqh-c[22]	MD	73	N	-	N	-	N	-	MD	70
19	46,XY,t(13;17)(q14;p172)[14]/46,XY[20]	MD	35	N	-	N	-	N	-	N	-
20	46,XY,t(6;13;16)(p12;q12;q24)[4]/46,XY[22]	MD	16	N	-	N	-	N	-	N	-
21	46,XX,t(6;13)(p21;q14)[3]/46,XX[53]	BD	13	N	-	N	-	N	-	N	-
22	46,XY,t(13;22)(q14;q11)[30]/46,XY[5]	MD	91	N	-	N	-	N	-	N	-
23	46,XY,del(13)(q14)[2]/46,idem,del(17)(p12)[5]/46,idem,der(13)t(13;17),der(17)del(17)(p12)t(13;17)(q14;q23)[5]/46,XY[8]	MD+BD	58 / 33	N	-	N	-	N	-	MD	49
24	46,XX,t(13;14)(q14;q32),del(17)(p12)[9]/46,XX[8]	MD	55	MD	46	N	-	N	-	MD	79
25	47,XY,+12[2]/47,idem,del(11)(q22q23)[2]/47,idem,t(9;13)(q31;q14)[3]/46,idem,dic(8;17)(p11;p11)[2]/46,XY[11]	MD+BD	7 / 20	N	-	T	64	MD	17	MD	12

Abbreviations: MD, monoallelic deletion; BD, biallelic deletion; N, nonaltered; T, trisomy.  
<sup>a</sup>This case was previously reported in Collado et al. (2006).

TABLE 2. Baseline Characteristics of Patients at Diagnosis

Patients characteristics	t(13q) (N = 25)	i-del(13q) (N = 62)	F-del(13q) (N = 295)	P-value
Median age at diagnosis (range)	68 (44–98)	70 (48–89)	68 (36–92)	0.654
Male	19 (76%)	36 (58.1%)	174 (59%)	0.245
Diagnosis				
MBL	4 (16%)	12 (19.4%)	69 (23.4%)	0.644
CLL Binet A	21 (84%)	41 (66.1%)	198 (67.1%)	
CLL Binet B	–	7 (11.3%)	21 (7.1%)	
CLL Binet C	–	2 (3.2%)	7 (2.4%)	
Absolute white blood cell count ( $\times 10^9/L$ )	16 (8.3–90)	16 (8.6–317)	16 (3.8–149)	0.603
Absolut lymphocyte count ( $\times 10^9/L$ )	12 (4.8–79.7)	12 (3.1–126.9)	10.5 (1.2–130)	0.240
Haemoglobin (g/dL)	14 (11–17)	14 (7–17)	14 (5–18)	0.123
Platelets ( $\times 10^9/L$ )	196 (133–274)	182 (34–397)	196 (10–492)	0.398
Lactate dehydrogenase (IU/L)	318 (133–591)	300 (116–927)	296 (81–1420)	0.952
Beta-2 Microglobulin (mg/L)	2.0 (1.1–4.5)	2.0 (1–9.2)	2.0 (0.4–13.4)	0.916
Adenopathies (n = 375)	6 (24%)	11 (18.3%)	53 (18.3%)	0.850
Splenomegaly (n = 375)	2 (8%)	9 (15.3%)	18 (6.2%)	0.051
Hepatomegaly (n = 376)	3 (12%)	3 (5%)	17 (5.8%)	0.409
ZAP-70 positive (n = 176) <sup>a</sup>	5/11 (45%)	10/18 (56%)	40/147 (27.2%)	0.031
CD38 positive (n = 310) <sup>a</sup>	1/20 (5%)	4/47 (9%)	47/243 (19.3%)	0.075
Treated patients	13/25 (52%)	29/62 (47%)	74/295 (25.1%)	<0.001
Median time to first treatment (months, 95% CI)	67 (50–84)	44 (7–82)	137 (75–200)	0.029
Deaths	8/25 (32%)	15/62 (24.2%)	39/295 (13.2%)	0.009
Median overall survival (months, 95% CI)	NR	NR	NR	
Median follow-up (months)	56 (4–165)	60 (0–219)	33 (0–269)	0.003

Abbreviations: NR, not reached.

<sup>a</sup>Positivity was considered when ZAP70 > 20% and CD38 > 30%.

Other variables, such as percentage of 13q-deleted cells in the FISH analysis, concomitant *ATM* and/or *TP53* deletions and CD38 positivity also showed a significant impact on the TFT (Table 3 and Figs. 1C–1E). In the multivariate analysis, all variables preserved an independent effect on TFT (Table 3). At the end of the study, a total of 62 patients (16%) died after a median follow-up of 33 months (range: 0–269). As the median OS was not reached in any of the studied groups, statistical analyses on OS were not performed (Table 2).

## DISCUSSION

Deletion 13q is the most frequent cytogenetic abnormality in CLL and has been typically considered a good prognostic marker when detected as a sole abnormality. Nonetheless, several groups have shown that the size of the deletion or the percentage of abnormal nuclei detected by FISH can modify the prognosis of 13q losses (Hernandez

et al., 2009; Mosca et al., 2010; Van Dyke et al., 2010; Dal Bo et al., 2011; Ouillette et al., 2011; Mian et al., 2012; Orlandi et al., 2012). It is well-known that translocations involving 13q14 are identified in a proportion of CLL patients with abnormal karyotypes. In this regard, some groups have attempted to better characterize these abnormalities, but large series with cytogenetic data published so far are scarce. While only seven of the 30 patients with 13q translocations initially described in 1997 were well studied by FISH (Gardiner et al., 1997), subsequent studies with extensive FISH characterization of the associated 13q deletion included a reduced number of CLL patients (Struski et al., 2007; Hrubá et al., 2012).

Herein, we have described a total of 25 different 13q14 translocations. Karyotypes showed a variable number of aberrations, however additional cytogenetic additional alterations were not more frequently detected in the t(13q) group compared to the i-del(13q) and F-del(13q) groups. In all

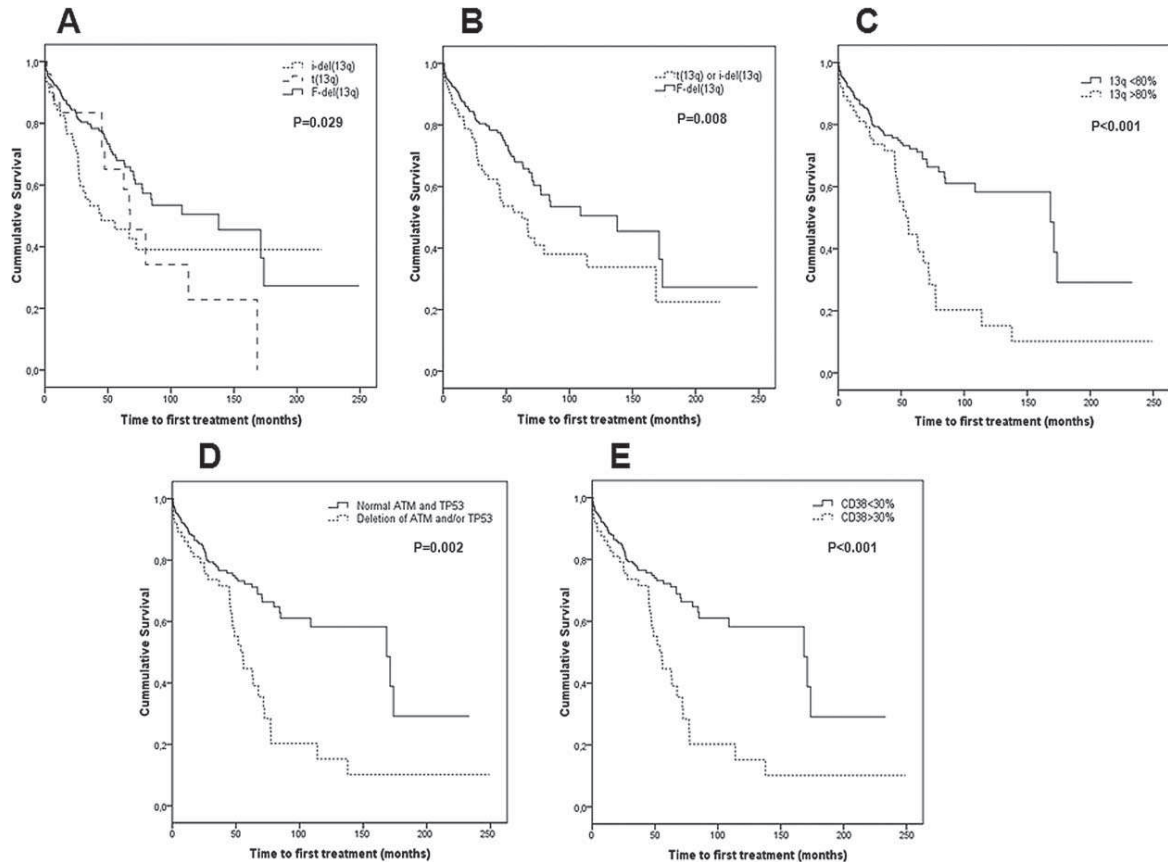


Figure 1. Kaplan Meier plots for TFT and (A) type of del(13q) group, (B) detection of 13q abnormalities by CGC, (C) percentage of 13q-deleted cells, (D) deletion of *ATM* and/or *TP53*, and (E) CD38 positivity.

TABLE 3. Univariate and Multivariate Analysis on Time to First Treatment

Variable		Univariate		Multivariate	
		TFT (95% CI)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value
13q abnormalities by CGC	t(13q) or i-del(13q)	62 (40–85)	0.008	1.74 (1.07–2.82)	0.025
	F-del(13q)	137 (75–200)			
Percentage of cells with 13q deletion	>80%	53 (43–63)	<0.001	1.89 (1.17–3.05)	0.009
	<80%	31 (106–230)			
<i>ATM</i> and/or <i>TP53</i> status	Deleted	55 (58–159)	0.002	2.49 (1.40–4.40)	0.002
	Nondeleted	108 (15–96)			
CD38 expression	>30%	45 (22–69)	<0.001	3.34 (2.00–5.57)	<0.001
	<30%	171 (55–287)			

groups, nearly 20% showed complex karyotypes. Regarding 13q14 translocations, none of the donor chromosome breakpoints was recurrent. As previously reported in CLL, we have confirmed deletion of the D13S319 locus in all the t(13q) patients (Gardiner et al., 1997; Hrubá et al., 2012). Only a few translocations of 13q in which 13q14 deletion was discarded are recorded in the literature.

Struski et al. described some 13q translocations with breakpoints telomeric or centromeric to 13q14 that preserved the D13S319 locus, but also a case with a translocation that split D13S319 and *RBI* probes and preserved both loci at metaphase FISH analyses (Struski et al., 2007). Although 13q14 rearrangements not necessarily imply losses in 13q14, we and others have demonstrated that

most of the translocated karyotypes are associated with deletion in 13q14. It has been described that 10% of patients with 13q14 deletion identified by FISH carried an abnormal karyotype which included associated 13q14 rearrangements (Hruba et al., 2012). An association between translocations and deletions involving the breakpoint has been described in other hematological malignances, such as 9q34-*ABL1* deletions in chronic myeloid leukemia with t(9;22) or 14q32-*IGH* deletions in follicular lymphoma with t(14;18) (Sinclair et al., 2000; Espinet et al., 2007). Altogether, our findings also support the hypothesis that the translocation results in the loss of one or more genes in 13q14 instead of the generation of a new fusion gene or activation of a proto-oncogene by translocation (Gardiner et al., 1997; Struski et al., 2007).

We have also analyzed whether any other associated feature of 13q14 deletions found in t(13q), i-del(13q) and F-del(13q) patients could differentiate the three groups. It has been recently described that patients with higher percentages of 13q-deleted nuclei by FISH have a worse outcome than those with lower rates of deleted cells (Hernandez et al., 2009; Dal Bo et al., 2011; Orlandi et al., 2012). The range of abnormal nuclei scored in our study was high. Nonetheless, significant differences in the median number of altered nuclei were found among the groups. F-del(13q) patients, who did not show any abnormality in chromosome 13 by CGC, displayed a significantly lower percentage of 13q-deleted nuclei by FISH. Besides, large 13q deletions or 13q14 rearrangements detectable by CGC were associated with higher percentages of abnormal cells by FISH, which could be associated with worse outcome.

Conversely, the incidence of biallelic losses in t(13q) patients (52%) was significantly higher than in i-del(13q) and F-del(13q) group (11.3% and 14.9%, respectively). Only four of the 11 t(13q) patients with biallelic deletions lost the second allele by an independent interstitial deletion detected in the translocated clone. Nevertheless, no metaphases in the FISH slides were available to define the origin of biallelic losses in seven patients with mosaicism of clones carrying monoallelic and biallelic deletions. Hruba et al. studied 13 cases with 13q translocations and detected monoallelic and biallelic deletions in the translocated clones, but also proved that the coexistence of independent clones with the del(13q) related to translocation and clones with i-del(13q) is not uncommon (38% of their patients; Hruba et al., 2012). The prognostic impact of biallelic 13q dele-

tions has been previously addressed. We and others have shown that the loss of a second allele could be a secondary event in the course of the disease, although this second hit does not seem to be enough to confer a worse prognosis in CLL (Dewald et al., 2003; Chena et al., 2008; Van Dyke et al., 2010; Rodriguez et al 2012; Puiggros et al., 2013).

In contrast, the involvement of *RB1* in the deleted region significantly correlates with poor clinical outcome in CLL patients with isolated 13q deletion (Ouillette et al., 2011; Mian et al., 2012). We have identified loss of the *RB1* gene in 32% of our t(13q) patients. The detection rate of *RB1* deletion in t(13q) patients differed between previous studies: while Struski et al. defined different translocation breakpoints and identified *RB1* losses only in 3/8 patients (38%), Hruba et al. identified a higher incidence (4/6 patients, 67%) and suggested that *RB1* deletion could indicate a more aggressive disease in t(13q) patients (Struski et al., 2007; Hruba et al., 2012). Our analysis detected *RB1* involvement rates similar to those described in large cohorts of unselected CLL patients with 13q deletion (20–25%), and not significantly different from those F-del(13q) patients with cryptic 13q deletion by CGC analyzed in the present study (31%). Thus, we assume that translocation of 13q14 is not associated with a higher incidence of large deletions (Ouillette et al., 2011; Mian et al., 2012). *RB1* involvement in the 13q deletion of i-del(13q) group was, however, significantly higher than previously reported (79%). As all patients included in this group carried 13q losses large enough to be detected by CGC, it is not unexpected that *RB1* was also deleted in a high proportion.

With regard to other abnormalities studied by FISH, 11q deletion and trisomy 12 were equally identified in t(13q), i-del(13q) and F-del(13q) patients. However, it is noteworthy that t(13q) patients showed a significantly higher frequency of 17p deletions (37.5% vs. 8.6% and 7.2%,  $P < 0.001$ ). None of the previous studies of 13q translocations have highlighted an increase of 17p deletion, but it is not surprising that t(13q) patients could carry a higher incidence of loss of *TP53*, which generates major genomic instability that favors genomic rearrangements. Nonetheless, this increased instability is not related to higher incidence of complex karyotypes than in the other groups.

The incidence of mutations affecting *NOTCH1*, *SF3B1*, and *MYD88* was low. Only two patients (11.8%) carried mutations in *NOTCH1* and none of

the other genes was mutated. Our findings are in accordance with the incidences described by others (Puente et al., 2011; Quesada et al., 2011). Thus, there is no correlation between 13q14 rearrangements and any of these mutations.

Regarding clinical and biological characteristics at diagnosis of t(13q) patients, besides higher ZAP70 expression and del(17p) incidence, no other statistically significant differences between these cases and patients with i-del(13q) or F-del(13q) were found. Neither was the clinical outcome of t(13q) cases different from i-del(13q) patients. However, both t(13q) and i-del(13q) groups showed a median TFT significantly lower than F-del(13q) (67, 44, and 137 months, respectively,  $P = 0.029$ ). Interestingly, detection of t(13q) or i-del(13q) by CGC retained their prognostic impact on TFT in the multivariate analysis. The prognostic significance of chromosomal translocations in CLL still remains controversial. While some authors have hypothesized that these genomic rearrangements contribute to a poorer outcome, a recent retrospective study demonstrated that not all the translocations are equivalent and 13q rearrangements preserve the good prognosis associated with 13q deletions (Mayr et al., 2006; Van Den Neste et al., 2007; Put et al., 2009; Baliakas et al., 2014). In contrast, t(13q) patients included in the present study have shown a shorter TFT and a statistically significant association with distinct genetic characteristics previously highlighted as poor prognostic markers in CLL (high percentages of 13q-deleted nuclei, biallelic deletions and concomitant 17p losses). Moreover, higher percentages of altered nuclei and *RBI* involvement, as well as shorter TFT, were also described in the i-del(13q) group. As gene expression studies have shown an increased proliferative and antiapoptotic activity in those patients with larger 13q deletions and higher percentages of deleted cells (Mosca et al., 2010; Rodriguez et al., 2012), it could be hypothesized that this deregulation in proliferative activity also triggers a the poorer outcome of t(13q) and del(13q) patients. Thus, although detection of t(13q) or del(13q) by CGC may not be poor prognostic factors per se, these patients are associated with several features that altogether contribute to a poorer outcome.

In conclusion, our results confirm that patients with 13q deletions associated with a t(13q) and those with interstitial 13q deletions detected in the karyotype or 13q deletions not detected by CGC do not show significant differences in their

clinical manifestation at diagnosis. Nonetheless, CLL patients with 13q abnormalities identified by CGC [t(13q) and i-del(13q)] are associated with shorter TFT than patients with del(13) only detected by FISH. Differences in certain biological features such as the incidence of 13q biallelic deletions, ZAP70 expression or associated 17p deletions could reflect that 13q14 translocations arise in a more unstable genomic context which favors a poorer outcome in t(13q) patients. The present study demonstrates that conventional CGC findings contribute to the characterization of the heterogeneity found in the whole group of CLL patients carrying 13q deletions.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The following investigators contributed by providing clinical or laboratory data to this study: Javier Grau (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona); Eugènia Abella, Carme Melero, Maria Rodríguez-Rivera, Lourdes Florensa (Hospital del Mar, Barcelona); Marcos González (Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca); Isana Benet and María José Terol (Hospital Clínico Universitario, Valencia); David Ivars and Felix Carbonell (Consorcio Hospital General Universitario, Valencia); Mar Osma (Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia); Eduardo Olavarría (Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona); and Carolina Muñoz (Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid).

#### REFERENCES

- Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, Malcikova J, Anagnostopoulos A, Glide S, Mould S, Stepanovska K, Brejcha M, Belessi C, Davi F, Pospisilova S, Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Oscier D. 2014. Chromosomal translocations and karyotype complexity in CLL: A systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol* 89:249–255.
- Chena C, Avalos JS, Bezares RF, Arrossagaray G, Turdo K, Bistmans A, Slavutsky I. 2008. Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: Cytogenetic, FISH and clinical studies. *Eur J Haematol* 81:94–99.
- Cheson BD, Bennett JM, Rai KR, Grever MR, Kay NE, Schiffer CA, Oken MM, Keating MJ, Boldt DH, Kempin SJ. 1988. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: Recommendations of the National Cancer Institute-sponsored working group. *Am J Hematol* 29:152–163.
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. 1996. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: Revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87:4990–4997.
- Collado R, Hueso J, Cabello AI, Oliver I, Egea M, Orero M, Miguel-Sosa A, Cigudosa JC, Benítez J, Barragán E, Carbonell F. 2006. New translocations in a case of atypical B-cell chronic lymphocytic leukemia: Involvement of ATM, MLL, and TP53. *Cancer Genet Cytogenet* 169:176–178.
- Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, Deambrogi C, Bertoni F, Del Giudice I, Palumbo G, Nanni M, Rinaldi A, Kwee I, Tassinio E, Corradini G, Gozzetti A, Cencini E, Ladetto M, Coletta AM, Luciano F, Bulian P, Pozzato G, Laurenti L, Forconi F, Di

- Raimondo F, Marasca R, Del Poeta G, Gaidano G, Foa R, Guarini A, Gattei V. 2011. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 50:633–643.
- Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C, James CD, Jelinek DF, Tschumper RC, Hanson CA, Pruthi RK, Witzig TE, Call TG, Kay NE. 2003. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: Correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 121:287–295.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1910–1916.
- Espinete B, Bellosillo B, Melerio C, Vela MC, Pedro C, Salido M, Pijuan L, Florensa L, Besses C, Serrano S, Solé F. 2007. FISH is better than BIOMED-2 PCR to detect IgH/BCL2 translocation in follicular lymphoma at diagnosis using paraffin-embedded tissue sections. *Leukemia Res* 32:737–742.
- Gardiner AC, Corcoran MM, Oscier DG. 1997. Cytogenetic, fluorescence in situ hybridisation, and clinical evaluation of translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukaemia. *Genes Chromosomes Cancer* 20:73–81.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. 2008. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111:5446–5456.
- Hernandez JA, Rodriguez AE, Gonzalez M, Benito R, Fontanillo C, Sandoval V, Romero N, Martin-Nunez G, de Coca AG, Fisac R, Galende J, Recio I, Ortuno F, Garcia JL, de las Rivas J, Gutierrez NC, San Miguel JF, Hernandez JM. 2009. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica* 94:364–371.
- Hruha M, Dvorak P, Weberova L, Subrt I. 2012. Independent coexistence of clones with 13q14 deletion at reciprocal translocation breakpoint and 13q14 interstitial deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 53:2054–2062.
- Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, Alpermann T, Roller A, Kohlmann A, Haferlach T, Kern W, Schnittger S. 2013. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia* 28:108–117.
- Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, Hallek M, Wendtner CM. 2006. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 107:742–751.
- Mian H, Rinaldi A, Mensah AA, Rossi D, Ladetto M, Forconi F, Marasca R, Gattei V, Zucca E, Cavalli F, Gaidano G, Kwee I, Bertoni F. 2012. Del(13q14.3) length matters: An integrated analysis of genomic, fluorescence in situ hybridization and clinical data in 169 chronic lymphocytic leukaemia patients with 13q deletion alone or a normal karyotype. *Hematol Oncol* 30:46–49.
- Mosca L, Fabris S, Lionetti M, Todoerti K, Agnelli L, Morabito F, Cutrona G, Andronache A, Matis S, Ferrari F, Gentile M, Spriano M, Callea V, Festini G, Molica S, Deliliers GL, Biccato S, Ferrarini M, Neri A. 2010. Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clin Cancer Res* 16:5641–5653.
- Orlandi EM, Bernasconi P, Pascutto C, Giardini I, Cavigliano PM, Boni M, Zibellini S, Cazzola M. 2012. Chronic lymphocytic leukemia with del13q14 as the sole abnormality: dynamic prognostic estimate by interphase-FISH. *Hematol Oncol* 31:136–142.
- Ouillette P, Erba H, Kujawski L, Kaminski M, Shedden K, Malek SN. 2008. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res* 68:1012–1021.
- Ouillette P, Collins R, Shakhani S, Li J, Li C, Shedden K, Malek SN. 2011. The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 17:6778–6790.
- Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Bea S, Gonzalez-Diaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, Lopez-Guerra M, Colomer D, Tubio JM, Lopez C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernandez JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutierrez-Fernandez A, Costa D, Carrio A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernandez L, Yague J, Nicolas P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjose S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpi JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigo R, Bayes M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, Lopez-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, Lopez-Otin C, Campo E. 2011. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 475:101–105.
- Puiggros A, Delgado J, Rodriguez-Vicente A, Collado R, Aventin A, Luno E, Grau J, Hernandez JA, Marugan I, Ardanaz M, Gonzalez T, Valiente A, Osma M, Calasanz MJ, Sanzo C, Carrio A, Ortega M, Santacruz R, Abrisqueta P, Abella E, Bosch F, Carbonell F, Sole F, Hernandez JM, Espinete B, Grupo Cooperativo Espanol de Citogenetica Hematologica (GCECGH) and Grupo Espanol de Leucemia Linfatica Cronica (GELLC). 2013. Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *Br J Haematol* 163:47–54.
- Put N, Meeus P, Chatelain B, Rack K, Boeckx N, Nollet F, Graux C, Van Den Neste E, Janssens A, Madoe V, Van Hoof A, Bilhou-Nabera C, Wlodarska I, Vandenberghe P, Michaux L. 2009. Translocation t(14;18) is not associated with inferior outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 23:1201–1204.
- Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordonez GR, Jares P, Bassaganyas L, Ramsay AJ, Bea S, Pinyol M, Martinez-Trillos A, Lopez-Guerra M, Colomer D, Navarro A, Baumann T, Aymerich M, Rozman M, Delgado J, Gine E, Hernandez JM, Gonzalez-Diaz M, Puente DA, Velasco G, Freije JM, Tubio JM, Royo R, Gelpi JL, Orozco M, Pisano DG, Zamora J, Vazquez M, Valencia A, Himmelbauer H, Bayes M, Heath S, Gut M, Gut I, Estivill X, Lopez-Guillermo A, Puente XS, Campo E, Lopez-Otin C. 2011. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 44:47–52.
- Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, Formigaro L, Rizzotto L, Tammiso E, Saccenti E, Bardi A, Cavazzini F, Ciccone M, Nichele I, Pizzolo G, Zaja F, Fanin R, Galieni P, Dalsass A, Mestichelli F, Testa N, Negrini M, Cuneo A. 2012. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood* 119:2310–2313.
- Rodriguez AE, Hernandez JA, Benito R, Gutierrez NC, Garcia JL, Hernandez-Sanchez M, Risueno A, Sarasquete ME, Fermin E, Fisac R, de Coca AG, Martin-Nunez G, de las Heras N, Recio I, Gutierrez O, De las Rivas J, Gonzalez M, Hernandez-Rivas JM. 2012. Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia patients with a high number of losses in 13q14. *PLoS One* 7:e48485.
- Shaffer L, McGowan-Jordan J, Schmid M. 2013. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger Medical and Scientific Publishers.
- Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, Telford N, Chang J, Reid A, Bench A, Champion K, Huntly B, Green AR. 2000. Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 95:738–743.
- Struski S, Helias C, Gervais C, Audhuy B, Zamfir A, Herbrecht R, Lessard M. 2007. 13q deletions in B-cell lymphoproliferative disorders: Frequent association with translocation. *Cancer Genet Cytogenet* 174:151–160.
- Van Den Neste E, Robin V, Francart J, Hagemeyer A, Stul M, Vandenberghe P, Delannoy A, Sonet A, Deneys V, Costantini S, Ferrant A, Robert A, Michaux L. 2007. Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia* 21:1715–1722.
- Van Dyke DL, Shanafelt TD, Call TG, Zent CS, Smoley SA, Rabe KG, Schwager SM, Sonbert JC, Slager SL, Kay NE. 2010. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 148:544–550.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every sale, purchase, and payment must be properly documented to ensure the integrity of the financial statements. This includes recording the date, amount, and purpose of each transaction.

Next, the document outlines the various methods used to collect and analyze financial data. It describes how different types of accounts are managed and how the resulting information is used to assess the company's overall financial health. The text also touches upon the role of internal controls in preventing errors and fraud.

The second section focuses on the preparation of financial statements. It provides a detailed look at the income statement, balance sheet, and cash flow statement, explaining how each is derived from the underlying accounting records. The document also discusses the importance of reconciling these statements to ensure they are accurate and consistent.

Finally, the document addresses the challenges of financial reporting and the need for transparency. It highlights the importance of providing clear and concise information to stakeholders and the role of auditors in verifying the accuracy of the financial statements. The text concludes by emphasizing the ongoing nature of financial management and the need for continuous improvement.

# Resultats Annexos

## Article 2



Figura S1

Esquema dels punts de trencament de les parelles de reordenament de 13q14. Es va identificar reordenament de 13q14 amb un total de 18 cromosomes diferents. Encara que cinc d'ells estaven involucrats en més d'una translocació, el punt de trencament de la parella cromosòmica de 13q14 no va ser comú en cap dels pacients inclosos a l'estudi.

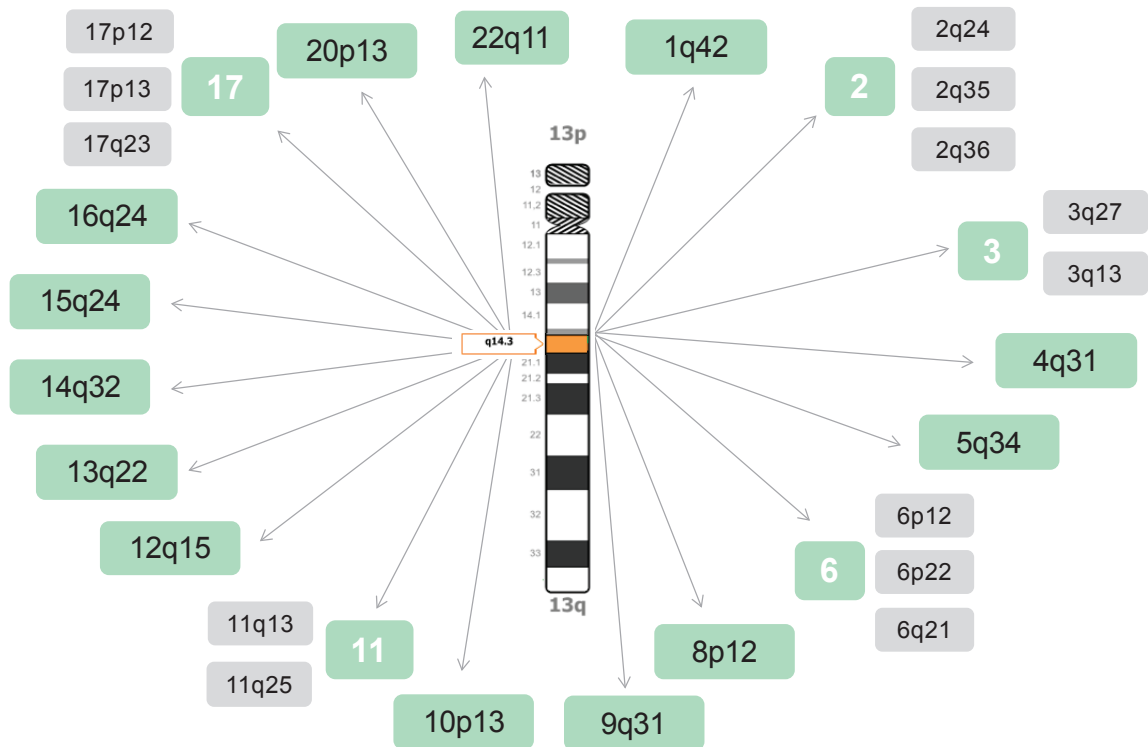
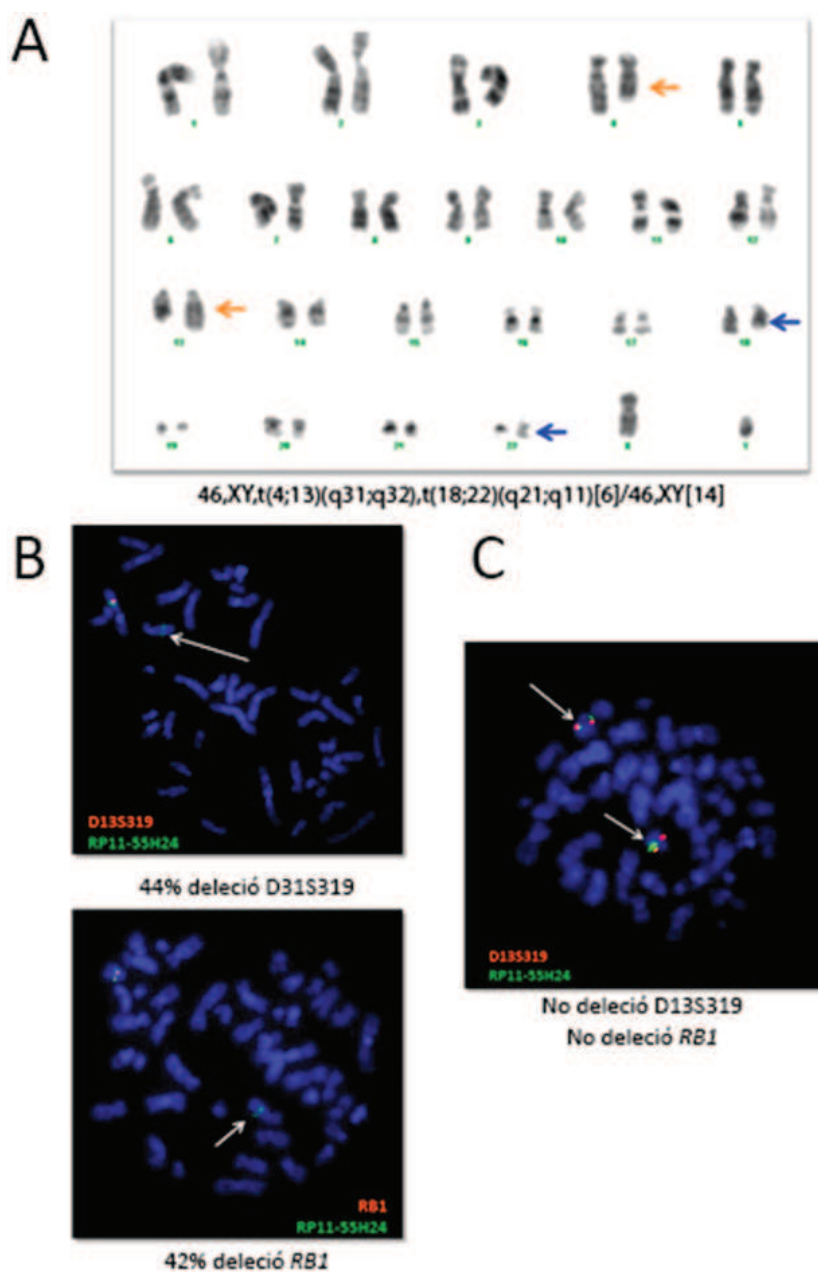


Figura S2

Cariotip i anàlisi de FISH en metafase d'un pacient inclòs a l'estudi. A l'estudi de citogenètica convencional de l'exemple es va obtenir un cariotip alterat amb una  $t(4;13)(q31;q32)$  [A], a més a més, es va identificar deleció dels *locus* D13S319 i *RB1* per FISH. L'anàlisi de metafases en les hibridacions de FISH va permetre demostrar que la deleció estava associada a la translocació [B], mentre que les metafases normals del pacient conservaven els dos al·lels de 13q14 [C].





## Article 3

*Genomic arrays in chronic lymphocytic leukemia routine clinical practice: are we ready to substitute conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization techniques?*

## Genomic arrays in chronic lymphocytic leukemia routine clinical practice: are we ready to substitute conventional cytogenetics and fluorescence *in situ* hybridization techniques?

Anna Puiggros<sup>1</sup>, Eulàlia Puigdecenet<sup>2</sup>, Marta Salido<sup>1,3</sup>, Ana Ferrer<sup>1,4</sup>, Eugènia Abe-lla<sup>5</sup>, Eva Gimeno<sup>5</sup>, Lara Nonell<sup>2</sup>, María José Herranz<sup>6</sup>, Ana Belén Galván<sup>3</sup>, María Rodríguez-Rivera<sup>1,3</sup>, Carme Melero<sup>3</sup>, Rosa Navarro<sup>4</sup>, Silvia Pairet<sup>7</sup>, Beatriz Bellosillo<sup>7</sup>, Sergi Serrano<sup>3,4,7</sup>, Lourdes Florensa<sup>1,4</sup>, Francesc Solé<sup>1,3</sup>, Blanca Espinet<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Recerca en Càncer. Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques (GRETNHE). IMIM-Hospital del Mar. Barcelona; <sup>2</sup>Servei d'Anàlisi de Microarrays. IMIM-Hospital del Mar. Barcelona; <sup>3</sup>Laboratori de Citogenètica Molecular. Servei de Patologia. Hospital del Mar-IMIM. Barcelona; <sup>4</sup>Laboratori de Citologia Hematològica. Servei de Patologia. Hospital del Mar. Barcelona; <sup>5</sup>Servei d'Hematologia Clínica. Hospital del Mar. Barcelona; <sup>6</sup>Servei d'Hematologia i Hemoteràpia. Hospital de Sant Pau i Santa Tecla. Tarragona; <sup>7</sup>Laboratori de Biologia Molecular. Servei de Patologia. Hospital del Mar. Barcelona. Spain

La leucèmia limfàtica crònica (LLC) és una entitat caracteritzada per presentar un curs clínic variable. Un dels factors pronòstics reconeguts en LLC són les alteracions citogenètiques, que s'estudien de forma rutinària per citogenètica convencional de bandes G (CC) i hibridació *in situ* fluorescent (FISH). Entre elles, les delecions de les regions 11q i 17p s'han associat a progressió de la malaltia i a una supervivència global curta. En els últims anys, les tècniques de *microarrays* genòmics han estat acceptades com a mètode d'alta resolució per detectar alteracions cromosòmiques. L'objectiu d'aquest estudi va consistir en comparar els resultats obtinguts amb l'aplicació de *microarrays* genòmics i els de CC i FISH, per determinar si les tècniques actuals poden ser complementades o substituïdes per la nova tecnologia en els laboratoris de citogenètica hematològica. Es va analitzar un total de 70 pacients amb LLC utilitzant les plataformes de *microarrays* Cytogenetics Whole-Genome 2.7M array i CytoScan HD array (Affymetrix), de forma paral·lela als estudis de CC i FISH per a les regions 13q14, 12, 11q22 i 17p13. Mentre que per CC i FISH es detectava un 31,4% i 38,6% de pacients amb anomalies genòmiques respectivament, aquestes taxes s'incrementaven quan s'afegia la informació obtinguda per *microarrays* (78,6% i 80%). La major taxa de detecció d'alteracions s'assolia amb la combinació de les tres tècniques (81,4%). No obstant, l'aplicació dels *microarrays* no va permetre la detecció d'un cas amb delecio de 11q i de tres

amb deleció de 17p, degut a la seva limitada sensibilitat. Amb aquests resultats, es va considerar que la completa substitució de la CC i el FISH per les plataformes de *microarrays* genòmics en els laboratoris de rutina podia afectar negativament al diagnòstic d'alguns pacients amb delecions de 11q o 17p i, en conseqüència, al seu tractament. En conclusió, en aquest treball es proposa com a primera línia d'estudi l'aplicació de la CC i dels *microarrays* genòmics, per obtenir una visió global de les alteracions genòmiques amb alta resolució, incloent també les translocacions equilibrades. A més a més, s'hauria de realitzar l'estudi de 11q i 17p per FISH si en aquesta primera aproximació no han estat detectades.

ORIGINAL ARTICLE: CLINICAL

## Genomic arrays in chronic lymphocytic leukemia routine clinical practice: are we ready to substitute conventional cytogenetics and fluorescence *in situ* hybridization techniques?

Anna Puiggros<sup>1</sup>, Eulàlia Puigdecamet<sup>2</sup>, Marta Salido<sup>1,3</sup>, Ana Ferrer<sup>1,4</sup>, Eugènia Abella<sup>5</sup>, Eva Gimeno<sup>5</sup>, Lara Nonell<sup>2</sup>, María José Herranz<sup>6</sup>, Ana Belén Galván<sup>3</sup>, María Rodríguez-Rivera<sup>1,3</sup>, Carme Melero<sup>3</sup>, Rosa Navarro<sup>4</sup>, Sílvia Pairet<sup>7</sup>, Beatriz Bellosillo<sup>7</sup>, Sergi Serrano<sup>3,4,7</sup>, Lourdes Florensa<sup>1,4</sup>, Francesc Solé<sup>1,3</sup> & Blanca Espinet<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Recerca en Càncer, Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques (GRETNHE),  
<sup>2</sup>Servei d'Anàlisi de Microarrays, <sup>3</sup>Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, <sup>4</sup>Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia, and <sup>7</sup>Laboratori de Biologia Molecular, Servei de Patologia, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain, <sup>5</sup>Servei d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain and <sup>6</sup>Servei d'Hematologia i Hemoteràpia, Hospital de Sant Pau i Santa Tecla, Tarragona, Spain

### Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by a highly variable clinical course. Del(11q) and del(17p), routinely studied by conventional G-banding cytogenetics (CGC) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH), have been related to progression and shorter overall survival. Recently, array-based karyotyping has gained acceptance as a high-resolution new tool for detecting genomic imbalances. The aim of the present study was to compare genomic arrays with CGC and FISH to ascertain whether the current techniques could be substituted in routine procedures. We analyzed 70 patients with CLL using the CytoScan HD Array (Affymetrix), CGC and FISH with the classical CLL panel. Whereas 31.4% and 68.6% of patients presented abnormalities when studied by CGC and FISH, respectively, these rates increased when arrays were also analyzed (78.6% and 80%). Although abnormality detection is higher when arrays are applied, one case with del(11q) and three with del(17p) were missed by genomic arrays due to their limited sensitivity. We consider that the complete substitution of CGC and FISH by genomic arrays in routine laboratories could negatively affect the management of some patients harboring 11q or 17p deletions. In conclusion, genomic arrays are valid to detect known and novel genomic imbalances in CLL, but should be maintained as a complementary tool to the current techniques.

**Keywords:** Chronic lymphocytic leukemia, FISH, conventional G-banding cytogenetics, genomic arrays

### Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia among adults in Western countries and its clinical course is highly variable. Several prognostic markers

including cytogenetic abnormalities, ZAP-70, CD38 and CD49d expression or mutational status of the immunoglobulin heavy chain variable gene (*IGHV*) have been described [1–5]. Conventional G-banding cytogenetics (CGC) is a low resolution technique established as the gold standard for global screening of balanced and unbalanced chromosomal alterations in many hematological malignancies. As it requires dividing cells, CGC studies have been traditionally limited by the low mitotic rate of CLL cells in culture. Nevertheless, chromosomal abnormalities are detected in up to 50% of patients with CLL by this technique [6]. The use of new B-cell mitogens, such as CD40-ligand or CpG oligonucleotide and interleukin-2, improves the growth of CLL cells in culture, increasing the detection rate of chromosomal abnormalities [7,8]. However, many laboratories have not totally implemented these new mitogens in their routine procedures, in part due to use of the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. Despite FISH analysis being limited to the specific probes studied, it has overcome the mitotic limitation in CLL. Abnormalities are detected in up to 80% of patients with CLL using the classical CLL FISH panel to detect del(13q), trisomy 12, del(11q) and del(17p). Regarding the prognostic value of the above-mentioned aberrations, deletion in 13q, when detected as a sole FISH lesion, confers a good prognosis, while deletions in both chromosome bands 11q22 and 17p13 have been related to aggressive disease and poor responses to treatment [3]. Furthermore, array-based karyotyping has shown the ability of microarray platforms to better define DNA gains and losses and to identify cryptic CLL abnormalities not included in the FISH panel [9,10]. Some studies have correlated genetic complexity detected by microarrays with poorer clinical response to treatments and shorter overall

Correspondence: Blanca Espinet, Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Pg. Marítim, 25-29, 08003, Barcelona, Spain. Tel: 34-93-248-35-21; Fax: 34-93-248-31-31. E-mail: bespinet@parcdesalutmar.cat

Received 20 June 2012; revised 12 September 2012; accepted 14 September 2012

survival [11–14]. Moreover, recurrent aberrations in 2p, 8q, 8p and 20q, as well as 13q deletion breakpoints defined by microarrays, have also been indicated as prognostic modulators in CLL [15–20]. These findings highlight the potential of high-resolution microarray platforms in stratification of patients with CLL to identify those cases with high-risk disease and to set up risk-adapted therapeutic strategies. Although genomic complexity detected by microarrays is clearly related to the clinical course of patients with CLL, neither the CLL FISH panel nor genomic array techniques are a good choice to detect some balanced aberrations that could be essential for the differential diagnosis between CLL and other mature B-cell neoplasms [21].

The aim of the present study was to compare the Cyto-genetics Whole-Genome 2.7M Array (Cyto2.7) and CytoScan HD Array (CytoScan) from Affymetrix (Santa Clara, CA) with CGC and FISH, using the classical panel for CLL (13q14, 12, 11q22 and 17p13), in the detection of chromosomal abnormalities. In addition, we wanted to evaluate the advantages, the drawbacks and the usefulness of each technique to ascertain whether conventional methods could be substituted or complemented by arrays in routine hematological cytogenetics laboratories.

## Materials and methods

### Patients

Peripheral blood (PB) samples were obtained from 70 patients with CLL, either newly diagnosed or under follow-up in the Hospital del Mar of Barcelona from October 2009 to July 2011. Three of the patients had been treated before enrollment. All subjects signed an informed consent form in accordance with national and international guidelines (professional code of conduct, Declaration of Helsinki). The study group had a male to female ratio of 1.7:1 and a median age of 74 years (range: 44–88). Clinical data and patients' characteristics are presented in Table I.

### Conventional G-banding cytogenetics and FISH

Conventional G-banding cytogenetics studies were carried out on lymphoid cells from 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) stimulated 72 h PB cultures following standard procedures. A minimum of 20 metaphases were analyzed, when possible. FISH analyses were performed on fixed material from CGC cultures using the classical CLL panel (11q22.3, CEP12, 13q14 and 17p13 probes) according to the manufacturer's guidelines (Abbott Molecular, Abbot Park, IL). A minimum of 200 nuclei was evaluated for each probe.

### Cell isolation and DNA extraction

DNA was obtained for all 70 patients with CLL, 16 being from whole PB, 10 from PB mononuclear cells (PBMCs) purified by Ficoll gradient and 44 from PB CD19 positive cells. In the latter, B-cell selection by magnetic activated cell sorting (MACS) columns was performed after Ficoll gradient, using a B Cell Isolation Kit II or CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). The percentage of abnormal cells from total PB lymphocytes, defined by routine flow cytometry analyses, was higher than 45% in all cases (median: 81%). Genomic

Table I. Patient characteristics\*.

Characteristic	n = 70 (%)
Median age, years (range)	74 (44–88)
Male/female (ratio)	44/26 (1.7)
Binet stage	
A	62/70 (88.5%)
B	7/70 (10%)
C	1/70 (1.4%)
Leukocyte count × 10 <sup>9</sup> /L (range)	23.7 (10.0–113.3)
Lymphocyte count × 10 <sup>9</sup> /L (range)	17.1 (6.4–101.2)
Hemoglobin, g/dL (range)	14.1 (9.0–16.5)
Platelet count × 10 <sup>3</sup> /L (range)	182 (92–478)
LDH > 450 IU/L	8/67 (11.9%)
β <sub>2</sub> -Microglobulin > 2.1 mg/L	39/64 (60.9%)
ZAP-70 expression > 20%	20/48 (41.6%)
CD38 expression > 20%	17/35 (48.5%)
Unmutated <i>IGHV</i> gene	11/40 (27.5%)
Status of disease	
Diagnosis	16/70 (22.9%)
Stable disease	45/70 (64.2%)
Progression	9/70 (12.9%)
Median time from diagnosis to sampling, months (range)	37.1 (0–258)
Median follow-up, months (range)	57.1 (5.2–276)
Treatment requirement	12/70 (17.1%)
Exitus	4/70 (5.7%)

LDH, lactate dehydrogenase.

\*Patient characteristics are described at sampling. Values are no. positive/no. of patients (%) for categorical variables and median (min–max) for continuous variables. Follow-up was considered from diagnosis to end of study, treatment requirement considered during follow-up.

DNA was extracted from PB, PBMCs or CD19 positive cells using a Gentra Puregene kit (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at 4°C until used. The purity and concentration of genomic DNA was evaluated using an ND-1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE). The integrity was checked using a 2% agarose gel. Only DNA that fulfilled quality controls required by Affymetrix were submitted to an array procedure.

### Genomic array analyses

DNA from 69 patients was amplified, labeled and hybridized to the Affymetrix Cyto-genetics Whole-Genome 2.7M platform according to the manufacturer's protocol. One additional patient and 11 of the above described were also hybridized to the recently developed CytoScan HD array (Affymetrix). Parallel hybridizations in these 11 cases were performed to compare the sensitivity and resolution of both platforms and try to overcome some quality problems found in the Cyto2.7 results. Both arrays have been designed specifically for cytogenetics research, and offer more than two million markers across the genome, including both SNP probes and probes to detect copy number variations (Cyto-arrays). CEL files obtained by scanning Cyto2.7 and CytoScan arrays were analyzed with Chromosome Analysis Suite software (Affymetrix), using annotations of genome version NCBIV36 (hg19). Only those achieving the manufacturer's quality cut-off measures were included in the analysis. Gains and losses that affected a minimum of 50 markers in a 100 kbp length were initially considered. Moreover, all the data were visually revised to eliminate alterations reported in regions with low-density of markers or to visually define alterations present in a lower proportion of cells analyzed. As paired control DNA was not used, those alterations that



overlapped more than 50% with polymorphisms described in the Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>) and gains overlapping with regions of segmental duplications were discarded. Although Cyto2.7 and CytoScan were not mainly designed to detect copy-number neutral loss of heterozygosity (LOH), a global screening for LOH was performed. LOH was considered when detected in a region greater than 20 Mb in the whole genome, or 2 Mb in telomeres [22].

### Statistical analysis

Cyto-array and FISH results for each patient were compared and the McNemar test was applied to assess the significance of the discordances found. Furthermore, the impact of cellular separation in the Cyto-array results was studied. Fisher's exact test was applied to compare the discordance rate with FISH found in PB, PBMCs and CD19 positive cells. With regard to the amount of abnormalities detected in each type of sample, the Mann-Whitney *U*-test was applied. All the statistical analyses were performed using SPSS v.15 software (SPSS Inc, Chicago, IL), and *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Overview of alterations detected by conventional G-banding cytogenetics, FISH and Cyto-array

CGC detected abnormalities in 31.4% (22/70) of the cases studied, 67.1% (47/70) presented a normal karyotype, and only one case was non-informative owing to culture failure. Several numerical alterations were detected, trisomy 12 being the most frequent (9/22 altered cases, 40.9%). CGC also revealed translocations involving various chromosomes in nine cases, but none of them was recurrent in the studied cohort (Table II).

The CLL FISH panel identified abnormalities in 68.6% (44/70) of patients, eight of which presented combinations of two altered probes. The most common abnormality was deletion of 13q14 (36/70; 51.4%), followed by trisomy 12 (11/70; 15.7%), deletion of 17p13 (5/70; 7.1%) and deletion of 11q22 (4/70; 5.7%). From the 36 cases with 13q14 deleted, biallelic losses were detected in seven cases. In four patients FISH identified the coexistence of two subclones, with monoallelic and biallelic deletion of 13q14 each. The percentage of altered nuclei detected by the CLL FISH panel was highly variable, ranging from 9 to 93%.

Despite that all the array data included in the study achieved the manufacturer's quality cut-off measures, data from two patients were only used for comparison with FISH results due to the high background signal obtained from CEL files. Nevertheless, the Cyto-array technique had the highest detection rate of abnormalities: a total of 54/70 patients (77.1%) carried either copy number alterations (CNAs) or LOH. Although the majority of altered samples presented fewer than three CNAs (42/54, 77.8%), the number of CNAs detected in a single patient was up to 20. Losses were more commonly detected than gains (78% vs. 22%), with a median size of 2.2 Mb (range from 100.7 kb to whole chromosomes). The number of CNAs detected by Cyto-array did not differ

statistically when considering the type of sample analyzed (*p* = 0.499).

Higher detection rates of abnormalities were achieved with the combination of all techniques. Whereas 74.3% of patients (52/70) presented abnormalities when studied by conventional techniques used in daily routine (CGC and FISH), this rate increased when arrays were also studied. A total of 78.6% (55/70) and 80% (56/70) of altered karyotypes were identified with the addition of array study to FISH and CGC, respectively. In this regard, any CNA or LOH was detected in up to 81.4% of patients (57/70) when all three techniques were combined (Table III).

Consistent results were obtained in patients in whom parallel hybridizations in Cyto2.7 and CytoScan arrays were performed. Nevertheless, lower background was found in data obtained from CytoScan. Thus, three of the small abnormalities defined by CytoScan analysis could not be well delimited by Cyto2.7 due to the high "waviness" of the signal scanned from the arrays. On the other hand, none of the recurrent CLL abnormalities missed by Cyto2.7 was detected by CytoScan.

### Known recurrent CLL alterations detected by Cyto-array

Discordant findings between FISH and Cyto-array were found in six out of 70 patients (8.6%); nonetheless, these discrepancies were not statistically significant. All of them corresponded to deletions identified by FISH that were missed by arrays: two cases with del(13q) (20% and 47% of altered nuclei), three with del(17p) (10%, 19% and 22% abnormal nuclei, respectively) and one case with del(11q) (12% deletion by FISH) (Table IV). Thereby, concordance between FISH and arrays was substantially higher in cases with aberrations detected in over 25% of nuclei (97.9% vs. 72.2%).

Trisomy 12 was detected in 11 patients equally by both methods, even if represented at a low level in the culture studied by FISH (range: 12–74% of nuclei altered). Taking the type of sample hybridized in the array into consideration, no significant differences between PB, lymphocytes and CD19 positive cells were found in the concordance rate with FISH results (*p* = 0.72).

Regarding the characteristics of known recurrent CLL abnormalities detected by Cyto-array, loss of 13q14 was the most common and heterogeneous abnormality in the studied cohort (detected in 34/70 patients, 48.6%). A wide range of sizes for deletion 13q was identified, with a median size of 13q losses of 1.4 Mb (range 144 kb–31.1 Mb). All but one case included *DLEU2/MIR15A/MIR16-1* loci in the deleted region. Moreover, 13 large 13q deletions also involved the *RB1* locus (Figure 1). Concerning the homozygous deletions, Cyto-array only detected as homozygous losses four of the eight cases in which FISH analysis identified losses of both 13q14 loci. Notably, none of them reached 2 Mb size or involved the *RB1* locus. Nevertheless, arrays identified the coexistence of other subclones harboring larger monoallelic 13q deletion that included *RB1* in three of those patients. Overall, a minimal deleted region (MDR) of 135.7 kb was defined, not including *MIR15A/MIR16-1* loci (Figure 1).

Two patients had loss of *TP53* detectable by Cyto-array (2.9%). Both deletions were the consequence of large

Table II. Comparison between altered karyotypes obtained by conventional G-banding cytogenetics (CGC) and large abnormalities identified by Cyto-array\*.

Patient ID	Karyotype by CGC	Abnormalities by FISH (%)		Large abnormalities by Cyto-array			Comments, cause of discordance
		Type	Chromosome	Cyroband	Size (Mbp)	100% concordance CC-Cyto-array	
63	47,XX,+12,del(14)(q24q32)[10]/46,XX[10]	Gain	12	Whole chromosome	134	100% concordance	
57	46,XX,del(6)(q13q26)[4]/46,XX[16]	Loss	14	q24.1q32.1	22.6		
8	49,XX,+12,+18,+19[13]/46,XX[7]	Gain	6	q16.3q26	69.7		
		Gain	12	Whole chromosome	134		
		Gain	18	Whole chromosome	78.1		
25	46,XY,del(13)(q12q21)[8]/46,XY[10]	Loss	19	Whole chromosome	59.1		
28	46,XX,del(11)(q21q23)[2]/46,XX[18]	Loss	13	q14.1q21.2	16.2		
2	47,XX,+12[5]/46,XY[15]	Gain	11	q21q23	20.1		
13	47,XX,+12[16]/46,XY[4]	Gain	12	Whole chromosome	134		
18	47,XX,+12[17]/46,XY[3]	Gain	12	Whole chromosome	134		
34	47,XX,inv(9)(p11q12)c,+12[18]/	Gain	12	Whole chromosome	134		
66	46,XX,inv(9)(p11q12)c[2]	Gain	12	Whole chromosome	134		No division of CLL cells in cytogenetics culture
22	47,XX,+12[3]/46,XX[17]	Gain	13	q14.1q21.3	27.9		
		Loss	13	Whole chromosome			
62	46,XX[20]	Loss	2	q23.3q24.3	15.7		
70	46,XX[20]	Gain	12	Whole chromosome	134		
43	46,XXY[20]	Loss	14	q22.3q32.1	35.9		
		Loss	13	q14.2q31.1	31.3		
32	46,XX[20]	Loss	13	q14.1q22.2	31.1		
17	46,XXY[18]	Gain	2	p25p12	82.1		
56	46,XX[20]	Loss	8	Whole p arm	44		
		Gain	8	Whole q arm	99.8		
		Loss	15	q12q21.3	31.3		
		Gain	15	q23qter	26.3		
21	46,XX[20]	Loss	3	pterp24.1	19.1		
		Loss	4	pterp15.1	29		
		Loss	4	q34.1qter	17.4		
		Loss	17	Whole p arm	24.1		
		Gain	17	Whole q arm	56.1		
		Loss	18	pterp11.21	14.8		
5	46,XXY[20]	Loss	18	q12.2q21.3	26.2		
12	46,XXY[20]	Loss	5	q31q34	23.1		
23	46,XX,del(6)(q21q25)[4]/46,XX[16]	Gain	3	Whole chromosome	198		Cyto-array missed balanced translocations or CNAs low represented in cell population studied
		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		

(Continued)

Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by Universitat Pompeu Fabra on 11/12/12  
For personal use only.

Table II. (Continued)

Patient ID	Karyotype by CGC	Abnormalities by FISH (%)	Large abnormalities by Cyto-array				Comments, cause of discordance
			Type	Chromosome	Cyto-band	Size (Mbp)	
27	46,XX,del(13)(q21q23)[2]/46,XX[18]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
24	45,XY,-13,der(20)t(13;20)(q14;p13)[10]/46,XY[10]	13q- (93%)	Gain	8	q21.3qter	59.3	
26	46,XX,t(5;13)(q34;q14),inv(9)(p11q12)c[2]/46,XX,t(5;13)(q34;q14),inv(9)(p11q12)c,t(13;19)(q12;q13)[1]/46,XX[17]	n.d.	Loss	13	q14.1q21.3	19.4	
	46,X,-Y,+12[6]/46,X,-Y,t(1;17)(q43;q21),+12[7]/46,XY[2]		Loss	20	pterp12.1	15.3	
61	46,XX,t(2;13)(q36;q14)[8]/46,XX[4]	+12 (56%)	Gain	12	Whole chromosome	134	
33	46,XX,t(14;18)(q32;q21)[13]/46,XY[7]	13q- (77%)	n.d.	n.d.	Whole chromosome	59.4	
65	46,XX,t(18;22)(q21;q11)[18]/46,XY[2]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
36	47,XX,+12[11]/47,XX,t(2;18)(p12;q21),+12[2]/46,XX[3],	+12 (70%)	Gain	12	Whole chromosome	134	
69	Rev: 47,XX,+12[22]/47,XX,+12,der(17)t(17;21)(p11;q11)[2]/46,XX[8]	17p- (26%)	Loss	17	p11.2pter	18.7	Karyotype corrected after Cyto-array analysis
51	47,XX,+22[2]/46,XX[18],	13q- (74%)	Gain	22	Whole chromosome	51.3	
	Rev: 47,XX,+22[1]/47,XX,del(X)(p11p22),+22[1]/46,XX[18]		Loss	X	p22.33p11.22	51	
55	47,XX,+12[3]/46,XX[17], Rev: 47,XX,+12[1]/46,XX,-X,+12[2]/46,XX[17]	+12 (58%)	Gain	12	Whole chromosome	134	
14	46,XY,t(9;11)(q34;q13),t(22)(q10)[20], Rev: 46,XY,der(9)t(2;9)(p13;q34), del(11)(q14q23),i(22)(q10)[20]	11q- (93%) 13q- (43%)	Gain	2	p25.3p13.3	69.6	
			Loss	11	q14.1q23.3	37.7	
			Loss	22	Whole p arm	13.9	
			Gain	22	Whole q arm	34.4	

FISH, fluorescence *in situ* hybridization; n.d., no abnormalities detected; CGC, conventional G-banding cytogenetics.

\* Known CLL abnormalities identified by FISH: +12, trisomy 12; 13q- , deletion 11q22; 17p- , deletion 17p13; percentage of altered nuclei is indicated in parentheses. In those patients in which whom abnormalities where initially missed in CGC analysis, initial karyotype is shown in italics and karyotype corrected after Cyto-array analysis is shown as Rev.

Table III. Overview of abnormality detection rate by conventional G-banding cytogenetics, FISH\*, Cyto-array and combination of techniques.

Method	Altered patients (%)
CGC	22 (31.4)
FISH	44 (68.6)
Cyto-array	54 (77.1)
CGC + FISH	52 (74.3)
CGC + Cyto-array	56 (80.0)
FISH + Cyto-array	55 (78.6)
CGC + FISH + Cyto-array	57 (81.4)

CGC, conventional G-banding cytogenetics; FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

\*Probes for deletion 13q, trisomy 12, deletion 11q and deletion 17p.

chromosomal abnormalities, one case showing an isochromosome 17q and the other displaying a loss affecting almost the whole 17p arm. Similarly, all three deletions including the *ATM* locus involved a large proportion of the 11q arm. The MDR of 20.1 Mbp for 11q deletion included several genes.

### Other large copy-number aberrations

Apart from known recurrent abnormalities, arrays identified 27 large CNAs (> 10 Mb, CGC resolution) in 15/70 patients studied (Table II). Trisomies were more commonly detected than isochromosomes or losses of whole chromosomes, although none of them were recurrent in the studied cohort. Two patients harboring 13q14 deletion presented trisomy 3 and trisomy 22, respectively, and trisomies 18 and 19 were both identified in a single patient with concomitant deletion of 13q14 and trisomy 12. Interestingly, the only losses of whole chromosomes affected sexual chromosomes (one loss of X and Y each) in two patients with trisomy 12. Gains of the whole q arm and concomitant losses of the p arm suggested the presence of non-recurrent i(8q), i(17q) and i(22q), and indeed CGC confirmed the latter. When excluding abnormalities affecting the whole chromosome, losses were over-represented (74% losses vs. 26% gains), and the median size of these CNA was 26.3 Mb (range 14.8–82.1 Mb). Most of these abnormalities were non-overlapping; however, two recurrent CNAs were identified: two cases of gain of 2p13.3p25.3, which included the *MYCN* locus and had concomitant del(13q) and del(11q), and two patients with del(14)(q24.1q32.1) and trisomy 12.

To evaluate the increase in detection of large CNAs using Cyto-array technology, a comparison with CGC results was performed (Table II). Even though 32/70 patients (45.7%) presented large abnormalities either by CGC or arrays, concordant results were obtained in only 10 of them. Arrays

identified large abnormalities in 10 patients with a normal karyotype. Moreover, four CGC results where some abnormalities were initially omitted or misinterpreted could be corrected owing to array interpretation. On the other hand, translocations and some alterations detected in small clones by CGC were missed by arrays (eight patients).

### Other small copy-number aberrations

Regarding small CNAs ( $\leq 10$  Mb), a total of 47 losses and eight gains ranging from 100.7 kb to 9.9 Mb were detected (median size: 512.6 kb). These abnormalities were distributed among all the genome, the only recurrent small CNAs being those deletions affecting several loci on 2q (2q35, 2q36), 14q (14q23, 14q24–q31) and 9q31. Some of the remaining losses partially overlapped with large CNAs on chromosome arms 4p, 6q, 15q and 18p (Table V).

### Detection of copy-number neutral loss of heterozygosity

Among the 70 patients studied, one or more LOH were identified in nine cases (12.9%). A total of 12 telomeric LOH were detected in various chromosomes, and the median size was 4.25 Mb (range: 5.36–71.05 Mb). Two of the LOH, in 20q and 22q, were identified in two different patients who did not share any other genetic feature. Interestingly, the largest LOH included the *ATM* locus and was detected in a patient carrying deletion 13q as unique known recurrent CLL abnormality.

### Discussion

In the present study, we have evaluated the benefits and the applicability of Cyto-arrays in comparison to conventional G-banding cytogenetics and FISH techniques used in routine clinical practice in CLL. Patients with CLL have been extensively studied by a wide range of genomic arrays. However, to our knowledge, this is the largest series comparing all three techniques. Previous studies have mainly focused on FISH and genomic array comparison, as well as prognostic evaluation of the detected chromosomal abnormalities [14,23–25]. Nevertheless, cytogenetics data in these series are scarce [26–28].

### Overall abnormalities detection rate

Our data confirm that Cyto2.7 and CytoScan have a higher detection rate of abnormalities than conventional techniques (77.1% vs. 31.4% for CGC and 68.6% for FISH).

Table IV. Detection of known recurrent CLL abnormalities by FISH and Cyto-array in 70 patients with CLL.

Abnormality	FISH		Cyto-array				
	n (%)	Median % altered nuclei (range)	n (%)	Median size (range)	MDR size	Concordance	p-Value*
Deletion 13q14	36 (51.4)	60% (14–92)	34 (48.6)	1.40 Mbp (0.14–31.13)	0.13 Mbp	95.7%	0.50
Trisomy 12	11 (15.7)	58% (12–74)	11 (15.7)	–	–	100%	–
Deletion 11q22	4 (5.7)	59.5% (12–93)	3 (4.3)	37.68 Mbp (20.12–46.61)	20.12 Mbp	98.6%	1.00
Deletion 17p13	5 (7.1)	19% (19–68)	2 (2.9)	21.41 Mbp (18.76–24.05)	18.76 Mbp	94.3%	0.63

CLL, chronic lymphocytic leukemia; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; MDR, minimal deleted region.

\*p-Value obtained in McNemar test to assess significance of discordance found.

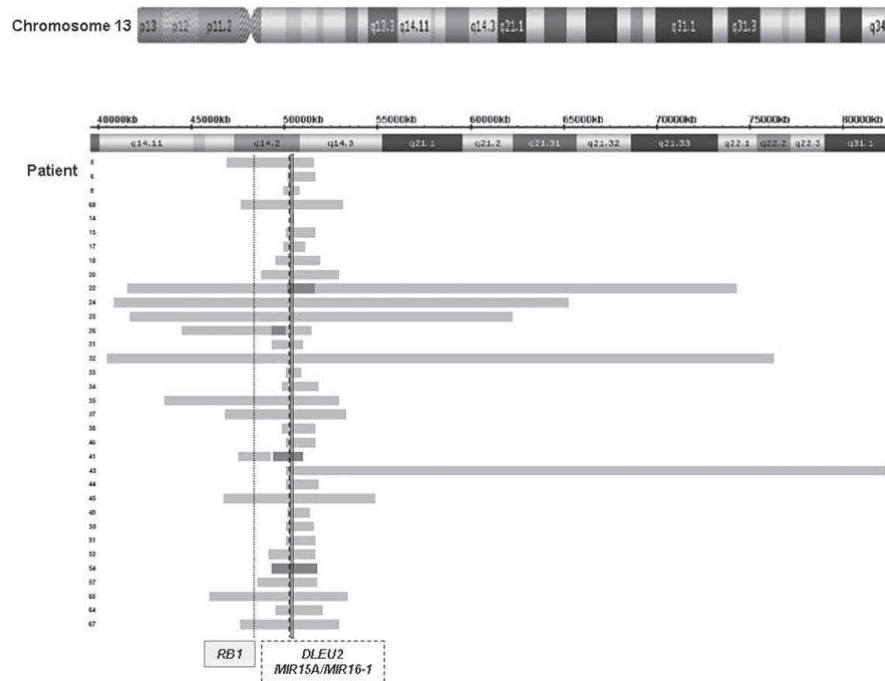


Figure 1. Deletions of 13q14 identified by Cyto-array. Losses for each patient are represented as gray bars, as deep gray those regions where biallelic deletion was identified. Vertical black lines limit the minimal deleted region found between all 13q14 deletions. Dotted and dashed lines indicate *RB1* locus and *DLEU2/MIR15A/MIR16-1* loci, respectively. Cyto-array only identified monoallelic deletions in some patients in whom FISH analysis identified losses of both 13q14 loci (patients 6, 33, 34 and 57).

Cyto-array analysis has identified 55 small copy-number aberrations and 12 LOH otherwise non-detectable by conventional routine procedures. Furthermore, it has allowed us to redefine four karyotypes and to identify large abnormalities in 10 additional patients with normal results by CGC. In contrast, eight patients (11.4%) of the studied cohort carried abnormalities only detected by CGC. Even though they are only eight cases, we consider that CGC should not be substituted but complemented by microarray technologies. It is particularly important for the detection of translocations, which could be helpful for differential diagnosis from mantle cell lymphoma if a t(11;14) is detected. Furthermore, some 11q and 17p have been missed by Cyto-array. As they are associated with aggressive disease, we consider that the complete substitution of conventional methods (CGC and FISH) by the use of Cyto-array in routine laboratories could negatively affect the management of some patients harboring 11q or 17p deletions.

#### Detection of known recurrent CLL abnormalities

Although the detection of known recurrent CLL alterations is slightly lower by Cyto-array than by FISH analysis, no significant differences have been found between both techniques. The overall concordance rate seen in the present study (91.4%) is comparable to previous studies, which have described concordances ranging from 79 to 98% [14,23,26,28,29].

All the discordant results of this study were due to the limited sensitivity of Cyto-array, which can be estimated by using the percentage of FISH altered cells. Nonetheless, one limitation of our study is that different samples have been analyzed by both techniques: while percentages of altered cells by FISH refer to cells from PB culture, Cyto-array studies have been applied with DNA from whole PB or selected lymphocytes. Differences in CNA detection might be caused by both technique sensitivity and CLL cell concentration in the sample studied. In addition, when calculating the cut-off point for Cyto-array sensitivity, the increase of del(13q) FISH detection in cultured PB should be considered (data not shown) [30]. Thus, we have set 25% of altered FISH as an approximate cut-off point for Cyto-array sensitivity, as previously described for other array platforms [9,11,14].

Referring to the discrepancies, our array analysis has failed to detect some 13q deletions, which would not negatively affect therapeutic decisions, but some del(11q) and del(17p) found in less than 20% nuclei by FISH have also been missed. We want to emphasize the hypothetical importance of detecting these small clones due to the possible clinical impact in patients with CLL. However, there is still some controversy regarding the optimal cut-off point for 17p deletion conferring inferior outcome (10–25%) [31–34].

On the other hand, Cyto-array has allowed us to define the size of deleted regions in known CLL abnormalities otherwise

Table V. Recurrent CNAs not included in FISH panel identified by arrays\*.

Patient ID	Known recurrent CLL alteration	Type	Chr.	Cytoband	Size (kbp)	Physical location		Genes included in common region†
						Start	End	
14	11q- (93%), 13q- (43%)	Gain	2	p25.3p13.3	69 642	297213	69939916	†Common region > 6 Mbp
17	11q- (80%), 13q- (46%)	Gain	2	p25p12	82 138	29477	82167516	
42	17p- (19%)	Loss	2	q35	529	219069173	219598850	<i>ARPC2, GPBARI, AAMP, PNKD,</i>
42	17p- (19%)	Loss	2	q35	387	219701147	220088582	<i>TMBIM1, C2orf62, SLC11A1, CTDSPI,</i>
21	17p- (68%)	Loss	2	q35	7704	216981980	224685566	<i>MIR26B, VIL1, USP37, RQCD1,</i> <i>PLCD4, ZNF142, BCS1L, RNF25,</i> <i>STK36, WNT6, WNT10A, CDK5R2,</i> <i>LOC151300, FEV, CRYBA2, MIR375,</i> <i>CCDC108, IHH, MIR3131, NHEJ1,</i> <i>SLC23A3, C2orf24, FAM134A,</i> <i>ZFAND2B, ABCB6, ATG9A</i>
42	17p- (19%)	Loss	2	q36.3	836	230845615	231681301	<i>SLC16A14, SP110, SP140, SP140L,</i>
21	17p- (68%)	Loss	2	q37.1	8898	234142215	243040512	<i>SP100, CAB39</i>
42	17p- (19%)	Loss	4	p15.2	173	26583268	26756281	<i>TBC1D19</i>
3	n.d.	Loss	4	p15.3	348	11880103	12228739	
21	17p- (68%)	Loss	4	pterp15.1	28 952	0	28952439	
57	13q- (19%)	Loss	6	q16.3q26	69 692	92897623	162590006	No genes
49	13q- (14%)	Loss	6	q25.3	108	159884631	159992367	
43	13q- (22%), 17p- (10%)	Loss	9	q31.1	209	105424871	105634004	No genes
21	17p- (68%)	Loss	9	q33.1	2013	120199349	122212027	
70	+12 (17%)	Loss	14	q22.3q32.1	35 932	57672173	93604511	<i>EXD2, GALNTL1, ERH, SLC39A9,</i>
63	+12 (52%)	Loss	14	q24.1q32.1	22 619	69262976	91882259	<i>UPF0639, C14orf162</i>
21	17p- (68%)	Loss	14	q23.3	5098	64953867	70051926	
42	17p- (19%)	Loss	14	q23.3	943	65488898	66432295	
42	17p- (19%)	Loss	14	q24.1	1548	68690656	70238567	
42	17p- (19%)	Loss	14	q24.2	2366	71068724	73434984	
21	17p- (68%)	Loss	15	q14	3304	37143076	40446844	<i>C15orf41, CSNK1A1P1, LOC145845,</i>
56	n.d.	Loss	15	q12q21.3	31 298	27105928	58404610	<i>MEIS2, TMC05A, SPRED1, FAM98B,</i> <i>RASGRP1, C15orf53, C15orf54, THBS1,</i> <i>FSIP1</i>
56	n.d.	Loss	18	p11.3	5973	60739	6033790	<i>USP14, THOC1, COLEC12, CETN1,</i> <i>CLUL1, C18orf56, TYMS, ENOSF1,</i> <i>YES1, ADCYAP1, C18orf2, METTL4,</i> <i>NDC80, LOC645158, SMCHD1,</i> <i>EMILIN2, LPIN2, LOC727896,</i> <i>MYOM1, MYL12A, MYL12B, TGIF1,</i> <i>DLGAP1, FLJ35776, LOC284215,</i> <i>LOC642597, C18orf18, LOC339290,</i> <i>ZFP161, EPB41L3, TMEM200C</i>
21	17p- (68%)	Loss	18	p11.3	14 770	170450	14940570	

CNA, copy number alteration; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; CLL, chronic lymphocytic leukemia; n.d., no abnormalities detected.

\*Known CLL abnormalities identified by FISH: +12, trisomy 12; 13q-, deletion 13q14; 11q-, deletion 11q22; 17p-, deletion 17p13; percentage of altered nuclei are indicated in parentheses.

†Gene names provided only if found in regions smaller than 6 Mbp.

not possible by studying the CLL FISH panel. Thus, we have been able to discriminate patients with large 13q deletions involving *RBI*, associated with shorter time to treatment and overall survival, from those with smaller losses comprising *DLEU2/MIR15A/MIR16-1* genes (13 vs. 21, the latter including all the biallelic deletions) [18,35].

#### Detection of aberrations not included in the CLL FISH panel

Regarding the detected abnormalities not included in the classical CLL FISH panel, a prognostic impact has been described for some of them. Among our patients, gains of 2p involving *MYCN* have been identified in two cases which also carried a concomitant 11q deletion, as described in the literature. In contrast, we have not found any association of 2p gains with a poor prognosis [16,19,36]. Gains of 8q, also reported as poor prognostic markers [19], have been identified in three patients. Although it has been reported to be more frequent in 17p-deleted patients [37], the coexistence with known recurrent CLL abnormalities in our series is restricted to 13q deletion and trisomy 12

(one patient each). Interestingly, the one that progressed, requiring treatment, acquired the gain as a consequence of an isochromosome 8q, and harbored four additional non-classical CNAs. To date, none of the remaining CNAs identified in our Cyto-array study have been indicated as prognostic modulators.

Several authors have associated the complexity detected by genomic arrays (number of CNAs or total size deleted) with either a shorter time to first treatment, a worse response to therapy or a shorter overall survival [11,13,14,29,36]. Although we have demonstrated the presence of  $\geq 2$  CNAs in 33 patients, we have not found any correlation between genomic complexity and progression requiring treatment (13/70 patients) or overall survival (4/70 patients have died) (data not shown).

#### Type of samples analyzed by genomic arrays

Despite the fact that we did not perform Cyto-array analyses in whole PB and purified lymphocytes from the same patient, we have demonstrated the feasibility of Cyto-array to detect abnormalities in whole PB samples from patients with CLL.

**RIGHTS LINK**  
Copyright Clearance Center

Moreover, no significant differences in the detection rate of alterations were found between different types of samples analyzed by Cyto-array. These findings are not unexpected, as CLL is characterized by an expansion of abnormal B cells in PB, which generally represent high percentages of the PB cellularity. Nonetheless, a purification step by Ficoll gradient could improve the abnormality detection rate of Cyto-array without a significant cost or time increase in the process. In our opinion, the availability of flow cytometry could be very useful to detect patients with low numbers of clonal B-cells (lower than 30% of lymphocytes). In these cases, Cyto-array studies should be performed in CD19 positive selected cells. Some authors have suggested algorithms for integration of array techniques into the clinical evaluation of CLL that are based on the proportion of tumoral cells detected by flow cytometry [13,23].

In summary, our results are similar to those previously reported, and demonstrate that these novel platforms are a valuable tool for genomic study of CLL. However, when evaluating their use in the routine hematological cytogenetics laboratories, we consider that conventional methods should not be completely substituted by arrays for the following reasons: (1) despite Cyto-array obtaining the highest abnormality detection rate, the independent prognostic value of most of these abnormalities has not been clearly revealed; (2) some known poor-prognosis abnormalities have been identified only by FISH analyses; (3) all three techniques are complementary: structural information is provided by CGC, while FISH and Cyto-array offer higher sensitivity and resolution, respectively. More studies are needed to define the prognostic value of novel chromosomal abnormalities detected by array and to establish a standard criterion for its future routine applicability. CGC and FISH should be maintained as a gold standard for current cytogenetics assessment in patients with CLL, but genomic arrays should be considered as a complementary technique.

**Potential conflict of interest:** Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at [www.informahealthcare.com/lal](http://www.informahealthcare.com/lal).

This work has been supported by the following grants: FI10/00625 and PI11/01621 from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, RD07/0020/2004 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), RD09/0076/00036, FEDER, 2009/SGR541 from Generalitat de Catalunya and "Xarxa de Bancs de Tumors" sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC).

## References

[1] Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-1847.  
 [2] Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-1854.  
 [3] Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-1916.

[4] Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004;363:105-111.  
 [5] Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:893-901.  
 [6] Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990;323:720-724.  
 [7] Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, et al. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 2006;108:3152-3160.  
 [8] Put N, Konings P, Rack K, et al. Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin-2 stimulation: a Belgian multicentric study. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48:843-853.  
 [9] Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1039-1044.  
 [10] Sargent R, Jones D, Abruzzo LV, et al. Customized oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization as a clinical assay for genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia. *J Mol Diagn* 2009;11:25-34.  
 [11] Kujawski L, Ouillette P, Erba H, et al. Genomic complexity identifies patients with aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;112:1993-2003.  
 [12] Gunnarsson R, Staaf J, Jansson M, et al. Screening for copy-number alterations and loss of heterozygosity in chronic lymphocytic leukemia—a comparative study of four differently designed, high resolution microarray platforms. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:697-711.  
 [13] Kay NE, Eckel-Passow JE, Braggio E, et al. Progressive but previously untreated CLL patients with greater array CGH complexity exhibit a less durable response to chemoimmunotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;203:161-168.  
 [14] Ouillette P, Collins R, Shakhani S, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118:3051-3061.  
 [15] Ouillette P, Erba H, Kujawski L, et al. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res* 2008;68:1012-1021.  
 [16] Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, et al. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk Res* 2010;34:63-68.  
 [17] Mosca L, Fabris S, Lionetti M, et al. Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clin Cancer Res* 2010;16:5641-5653.  
 [18] Parker H, Rose-Zerilli MJ, Parker A, et al. 13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2011;25:489-497.  
 [19] Rinaldi A, Mian M, Kwee I, et al. Genome-wide DNA profiling better defines the prognosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2011;154:590-599.  
 [20] Rodriguez AE, Robledo C, Garcia JL, et al. Identification of a novel recurrent gain on 20q13 in chronic lymphocytic leukemia by array CGH and gene expression profiling. *Ann Oncol* 2012;23:2138-2146.  
 [21] Higgins RA, Gunn SR, Robetorye RS. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization for the identification of prognostically important genetic alterations in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Diagn Ther* 2008;12:271-280.  
 [22] Maciejewski JP, Tiu RV, O'Keefe C. Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2009;146:479-488.  
 [23] Gunn SR, Mohammed MS, Gorre ME, et al. Whole-genome scanning by array comparative genomic hybridization as a clinical tool for risk assessment in chronic lymphocytic leukemia. *J Mol Diagn* 2008;10:442-451.  
 [24] Hagenkord JM, Monzon FA, Kash SF, et al. Array-based karyotyping for prognostic assessment in chronic lymphocytic leukemia: performance comparison of affymetrix 10K2.0, 250K nsp, and SNP6.0 arrays. *J Mol Diagn* 2010;12:184-196.

- [25] Lehmann S, Ogawa S, Raynaud SD, et al. Molecular allelokaryotyping of early-stage, untreated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2008;112:1296-1305.
- [26] Tyybakinoja A, Vilpo J, Knuutila S. High-resolution oligonucleotide array-CGH pinpoints genes involved in cryptic losses in chronic lymphocytic leukemia. *Cytogenet Genome Res* 2007;118:8-12.
- [27] Kolquist KA, Schultz RA, Slovak ML, et al. Evaluation of chronic lymphocytic leukemia by oligonucleotide-based microarray analysis uncovers novel aberrations not detected by FISH or cytogenetic analysis. *Mol Cytogenet* 2011;4:25.
- [28] O'Malley DP, Giudice C, Chang AS, et al. Comparison of array comparative genomic hybridization (aCGH) to FISH and cytogenetics in prognostic evaluation of chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol* 2011;33:238-244.
- [29] Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, et al. Large but not small copy-number alterations correlate to high-risk genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia: a high-resolution genomic screening of newly diagnosed patients. *Leukemia* 2010;24:211-215.
- [30] Delgado J, Avenir A, Briones J, et al. The use of tetradecanoyl-phorbol acetate-stimulated peripheral blood cells enhances the prognostic value of interphase fluorescence in situ hybridization in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:327-332.
- [31] Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370:230-239.
- [32] Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: The M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 2009;114:957-964.
- [33] Oscier D, Wade R, Davis Z, et al. Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation. *Haematologica* 2010;95:1705-1712.
- [34] Delgado J, Espinet B, Oliveira AC, et al. Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *Br J Haematol* 2012 Jan 9. [Epub ahead of print]
- [35] Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:633-643.
- [36] Gunnarsson R, Mansouri L, Isaksson A, et al. Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2011;96:1161-1169.
- [37] Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, et al. Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion. *Br J Haematol* 2008;143:532-536.



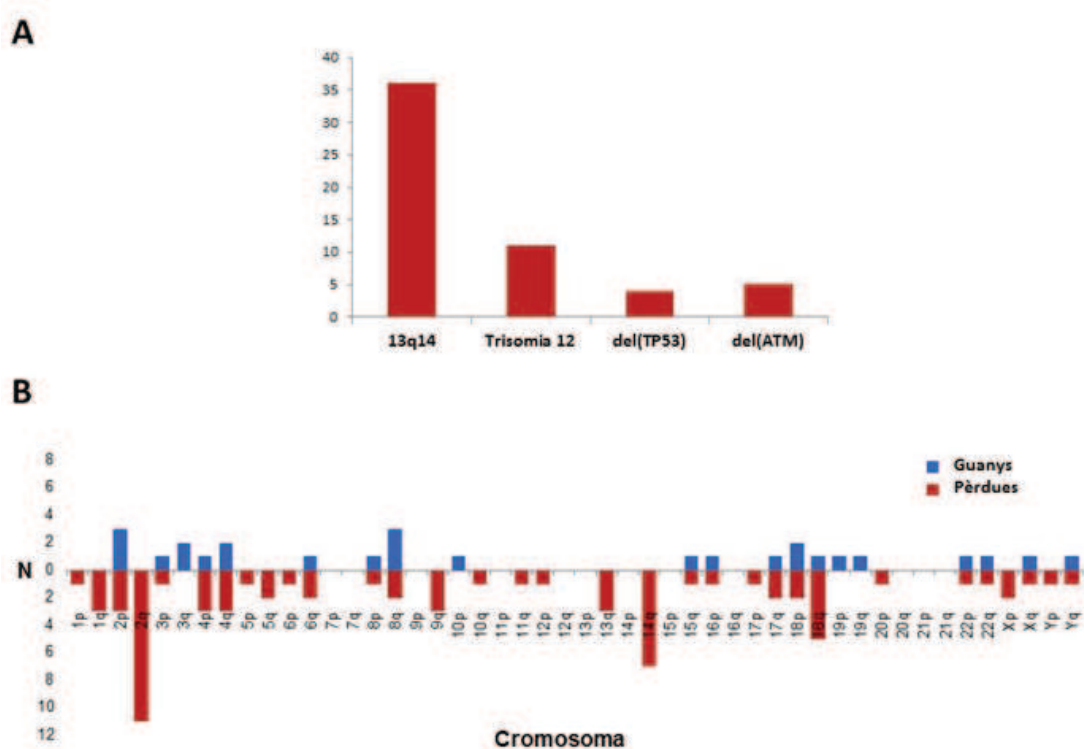


## Resultats Annexos

### Article 3

Figura S3

Resum de les alteracions identificades per *Cyto-arrays*. Els gràfics mostren el número de pacients amb alteracions recurrents identificades per *Cyto-arrays* [A], i el número d'alteracions no incloses al panell de FISH de rutina en LLC detectades al llarg del genoma [B].



## Taula S2

**Detall de les alteracions identificades per *Cyto-arrays*.** Les alteracions recurrents de LLC incloses al panell de FISH de rutina es mostren en verd. S'han exclòs de la taula les trisomies del cromosoma 12 detectades als pacients.

ID pacient	Alteració	Cromosoma	Citobanda inici	Mida (Kpb)	Inici	Final
48	Pèrdua	1	p31	116	72045687	72162233
42	Pèrdua	1	q23.2	1.357	160041620	161398676
61	Pèrdua	1	q42	233	225276675	225509181
56	Pèrdua	1	q42.2	8.291	233847101	242138221
66	Pèrdua	2	p16.1	290	58188307	58478411
12	Pèrdua	2	p16.1	460	56720646	57180270
42	Pèrdua	2	p22.3	124	32610735	32734951
42	Pèrdua	2	q13	725	111387282	112112628
23	Pèrdua	2	q31.2	110	179735945	179845665
42	Pèrdua	2	q32.2	4.492	190613316	195105000
42	Pèrdua	2	q32.3	140	196998849	197138647
21	Pèrdua	2	q33.3	6.142	208289160	214431237
42	Pèrdua	2	q35	513	219085011	219597651
42	Pèrdua	2	q35	387	219701147	220088582
21	Pèrdua	2	q35	7.704	216981980	224685566
42	Pèrdua	2	q36.3	780	230867503	231647437
21	Pèrdua	2	q37.1	8.898	234142215	243040512
31	Guany	3	q12.1	474	98633105	99107132
42	Pèrdua	4	p15.2	173.013	26583268	26756281
3	Pèrdua	4	p15.33	348.636	11880103	12228739
50	Pèrdua	4	q13.1	339.846	63491335	63831181
38	Pèrdua	4	q28	5.492	131603223	137095572
21	Guany	4	q32.3	3.498	168640773	172138884
42	Pèrdua	5	p13.2	225	37385763	37611164
44	Pèrdua	5	q15	102.749	97816157	97918906
19	Pèrdua	6	p21.31	333	36441685	36774592
36	Guany	6	q24.1	266.414	140198634	140465048
49	Pèrdua	6	q25.3	108	159884631	159992367

ID pacient	Alteració	Cromosoma	Citobanda inici	Mida (Kpb)	Inici	Final
13	Guany	8	q11.23	913	53969192	54881916
21	Pèrdua	8	q12.1	9.910	60190623	70100216
42	Pèrdua	8	q23.2	101	110762478	110863223
43	Pèrdua	9	q31.1	209	105424871	105634004
21	Pèrdua	9	q33.1	2.013	120199349	122212027
43	Guany	10	p13	156.752	15509825	15666577
48	Pèrdua	10	q24.32	745	103409340	104154183
62	Pèrdua	11	q12.3	212.661	62936204	63148865
28	Pèrdua	11	q21	20.128	94451303	114579604
14	Pèrdua	11	q14.1	37.686	78582285	116268732
17	Pèrdua	11	q14.1	46.613	79190865	125804230
21	Pèrdua	12	p12.3	1.327	16945402	18272519
14	Pèrdua	13	q14.2	144	50624755	50768669
15	Pèrdua	13	q14.2	913	50574089	51487058
17	Pèrdua	13	q14.2	951	50475256	51426445
18	Pèrdua	13	q14.2	1.422	50223298	51645622
18	Pèrdua	13	q14.3	333	55142801	55476148
20	Pèrdua	13	q14.2	2.607	49685425	52291932
22	Pèrdua	13	q14.2	927	50585224	51512647
22	Pèrdua	13	q14.11	27.983	45059449	73042709
24	Pèrdua	13	q11	4.594	19236679	23830381
24	Pèrdua	13	q14.11	1.261	44608438	45869699
24	Pèrdua	13	q14.13	18.008	45973137	63981127
25	Pèrdua	13	q14.11	16.195	45178602	61373968
26	Pèrdua	13	q14.2	927	50577323	51504453
26	Pèrdua	13	q14.13	4.561	46943287	51504453
31	Pèrdua	13	q14.2	933	50531214	51464371
32	Pèrdua	13	q14	31.130	44357824	75488208

ID pacient	Alteració	Cromosoma	Citobanda inici	Mida (Kpb)	Inici	Final
33	Pèrdua	13	q14.2	853	50574089	51427173
34	Pèrdua	13	q14.2	1.195	50432430	51626953
35	Pèrdua	13	q14.12	5.973	46354846	52327849
37	Pèrdua	13	q14.2	4.115	48441711	52556483
38	Pèrdua	13	q14	1.125	50381135	51506413
40	Pèrdua	13	q14.2	951	50544101	51494849
41	Pèrdua	13	q14.2	680	48914753	49594727
41	Pèrdua	13	q14.2	1.403	50101876	51504453
43	Pèrdua	13	q14.3	31003	50566755	81569918
44	Pèrdua	13	q14.2	1.048	50574089	51622004
45	Pèrdua	13	q14.2	5297	48420217	53718077
49	Pèrdua	13	q14.2	689	50632951	51321692
50	Pèrdua	13	q14.2	873	50565981	51439024
51	Pèrdua	13	q14.2	983	50544101	51527483
53	Pèrdua	13	q14.2	1.922	49563699	51485581
54	Pèrdua	13	q14	1.046	50484370	51530815
54	Pèrdua	13	q14.13	369	46764486	47133898
57	Pèrdua	13	q14	1.922	49563699	51485581
60	Pèrdua	13	q14	4.607	47984646	52591296
64	Pèrdua	13	q14.2	1.529	50226973	51755725
67	Pèrdua	13	q14.2	3.332	48953022	52284822
68	Pèrdua	13	q14.2	3.435	49030393	52465098
21	Pèrdua	14	q21.1	7.458	39583972	47042313
42	Pèrdua	14	q23.3	943	65488898	66432295
21	Pèrdua	14	q23.3	5.098	64953867	70051926
42	Pèrdua	14	q24.1	1.548	68690656	70238567
42	Pèrdua	14	q24.2	2.366	71068724	73434984
21	Pèrdua	15	q14	3.304	37143076	40446844
21	Pèrdua	16	p11.2	1.511	30430089	31941446
69	Pèrdua	17	p13.3	18.766	64214	18830220
21	Pèrdua	17	p13.3	24.058	0	24057841
21	Guany	17	q11	56.135	25060250	81195210
61	Pèrdua	17	q23.2	110	59823538	59934034
61	Pèrdua	17	q23.2	1.306	60448618	61754961

ID pacient	Alteració	Cromosoma	Citobanda inici	Mida (Kpb)	Inici	Final
56	Pèrdua	18	p11.32	5.973	60739	6033790
22	Guany	18	p11.32	167	1036133	1203028
21	Pèrdua	18	q11.2	5.562	20926978	26489263
21	Pèrdua	18	q22.1	870	65500624	66370187
68	Guany	x	q11.1	344	62858620	63202160
43	Guany	y	q11.2	279	18843145	19122408

## Exemples pràctics

Factors que poden modificar la sensibilitat dels *microarrays* i importància de l'anàlisi visual dels resultats.

Una de les limitacions identificades en aquest estudi va ser la menor sensibilitat dels *Cyto-arrays* per a la detecció d'anomalies cromosòmiques, que es va fixar en un 25% de nuclis alterats per FISH. Aquest valor s'ha de prendre com a punt de tall aproximat, ja que diversos factors poden influir en la detecció d'alteracions en aquells casos on el clon alterat està poc representat. Per una banda, la sensibilitat augmenta amb la mida de les alteracions. Així, mentre que la majoria de delecions petites detectades en menys d'un 25% de nuclis per FISH no es van poder identificar per *Cyto-arrays*, els guanys que afectaven cromosomes sencers, per exemple trisomies del cromosoma 12, es van poder detectar en pacients que tenien fins i tot un 12% de nuclis alterats per FISH (Figura S4). D'altra banda, es va constatar que, encara que representessin un baix percentatge per FISH, algunes delecions petites també podien ser identificades si els dos al·lels de la regió estaven alterats (Figura S5).

A continuació es presenten alguns casos que exemplifiquen els factors que poden modificar la sensibilitat del *Cyto-array*, així com la importància de l'anàlisi visual en aquests casos. Per a l'anàlisi dels exemples, realitzat amb el programa *Chromosome Analysis Suite* (ChAS, Affymetrix), cal tenir en compte els següents paràmetres:

### — *Copy Number State*:

Número de còpies que assigna el programa a una regió concreta. Els guanys i pèrdues identificats pel programa es presenten amb requadres blaus i vermells, respectivament.

— Weighted Log2 Ratio:

És la diferència entre la intensitat detectada en la mostra hibridada al *microarray* i la intensitat de referència per a cada sonda. S'expressa en escala logarítmica ponderada. Així, les regions normals tenen valors propers a zero i els valors es desvien cap a 1 o -1 si hi ha un guany o pèrdua, respectivament.

— Smooth Signal:

És la representació de la intensitat de fluorescència captada per a cada sonda del *microarray*. El valor corresponent a una regió diploide sense alteracions en el número de còpies és proper a 2.



## Figura S4

Detecció de trisomia 12 amb el programa *Chromosome Analysis Suite* a diferents nivells d'infiltració del clon alterat. Resultats obtinguts en un pacient amb un 70% de trisomia detectada utilitzant la tècnica de FISH [A], on el programa identificava correctament l'alteració. En pacients amb percentatges de FISH inferiors (12-17%), el programa identificava guany en mosaïcisme (senyals en blau discontinües i *Copy Number State* establert en 1-2) [B] o bé no detectava l'alteració amb els paràmetres establerts [C]. En aquest darrer cas, és important la revisió visual, en la qual s'observa un *Smooth Signal* inferior a 2 al llarg de tot el cromosoma 12 que permet detectar la trisomia.

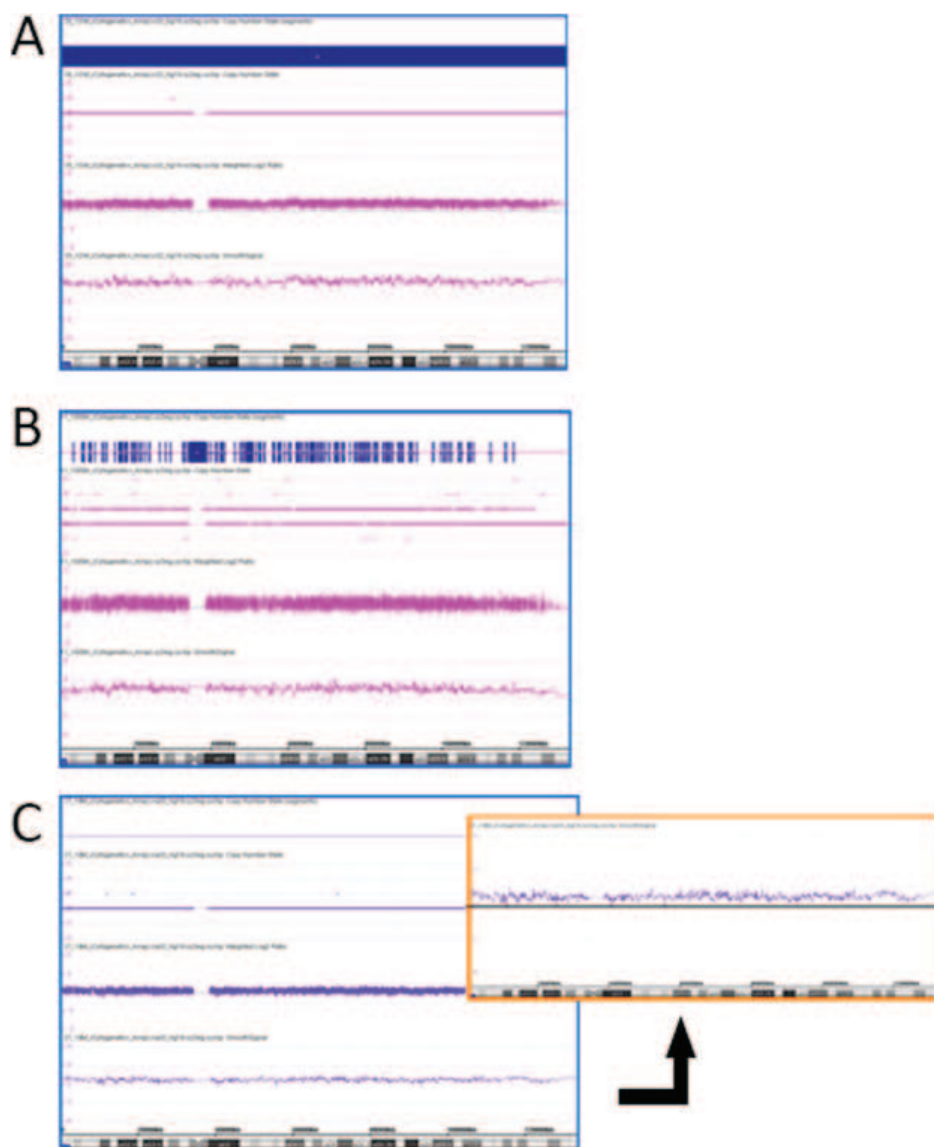
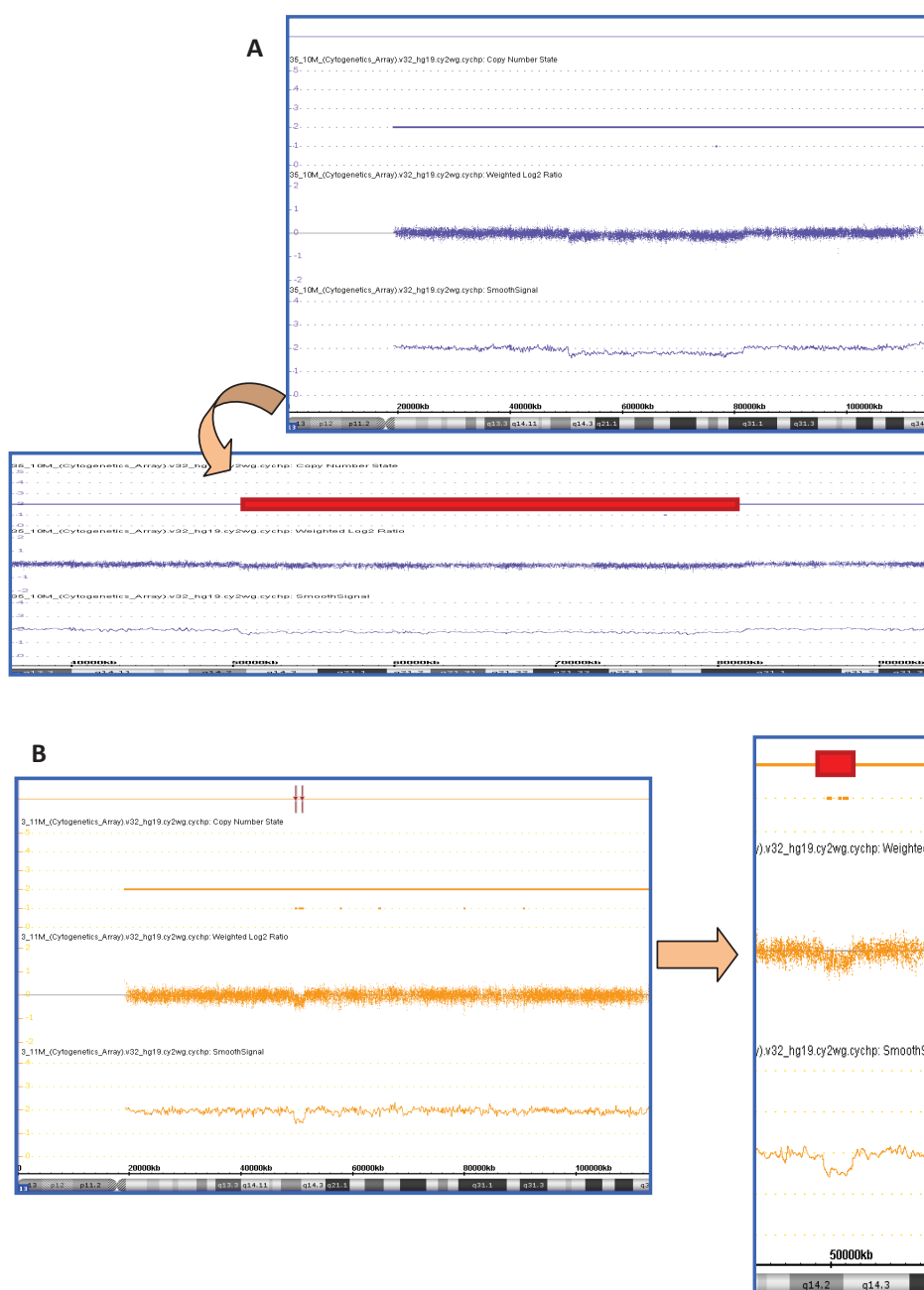


Figura S5

Detecció visual de la deleció de 13q14 amb el programa *Chromosome Analysis Suite*. Resultats obtinguts en dos pacients amb menys del 20% de nuclis amb deleció de 13q14 per FISH. En cap d'ells el programa detectava automàticament la deleció, però va ser possible una correcció visual dels resultats degut a la mida gran de la pèrdua [A] o a l'afectació dels dos al·lels malgrat ser una pèrdua petita [B].



## Figura S6

Exemple de la correcció del cariotip obtingut per citogenètica convencional de bandes G després de l'anàlisi de *microarrays* (I). A l'estudi inicial es va establir un cariotip que incloïa una  $t(9;11)(q34;q13)$  i concordava amb una possible associació de la translocació amb la  $del(11q)$  detectada al 93% de nuclis per FISH. No obstant, l'aplicació de *Cyto-array* va evidenciar la presència d'un guany a 2p i una deleció a 11q22 prou grans com per ser detectades amb el nivell de resolució de la CC. Finalment es va revisar el cariotip, corregint la fórmula citogenètica: el material afegit a 9q procedia del cromosoma 2 i que l'alteració observada al cromosoma 11 corresponia a una deleció intersticial de 11q.

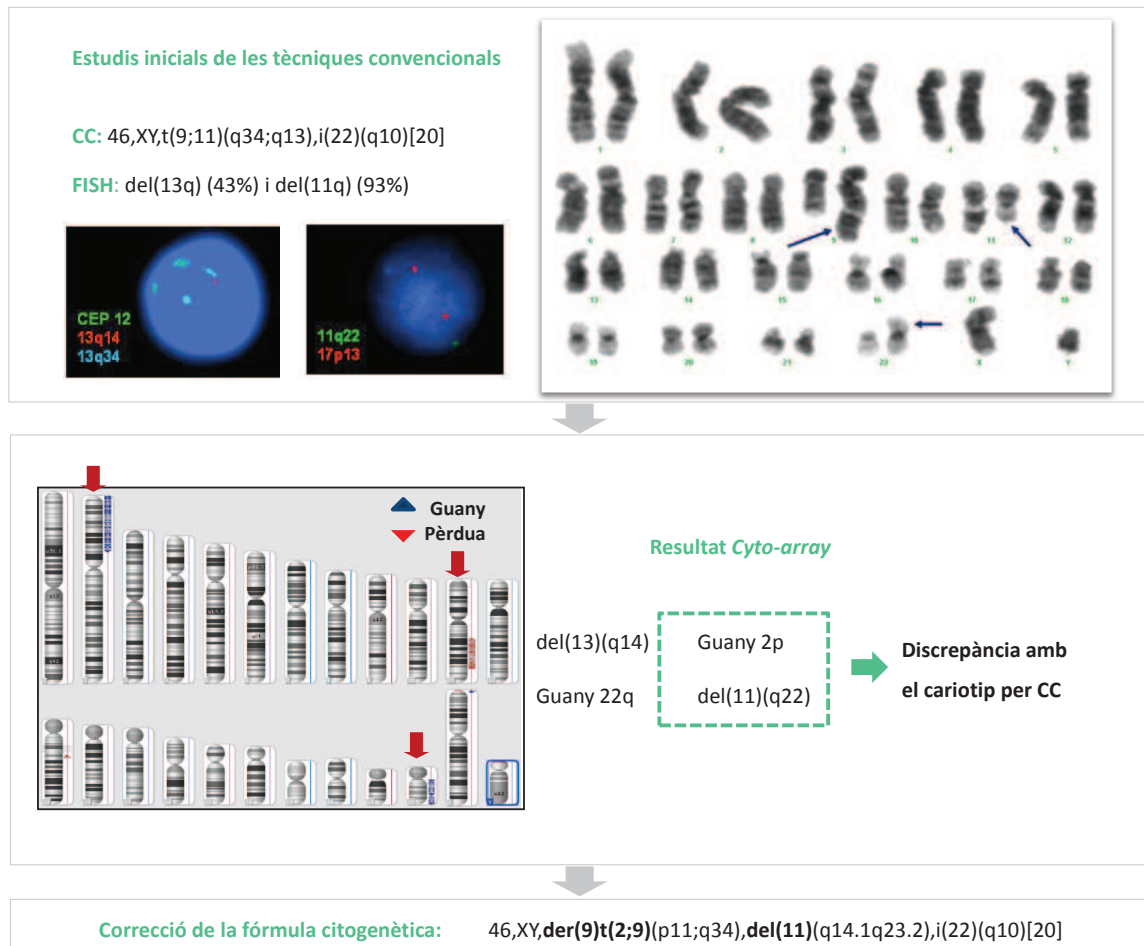
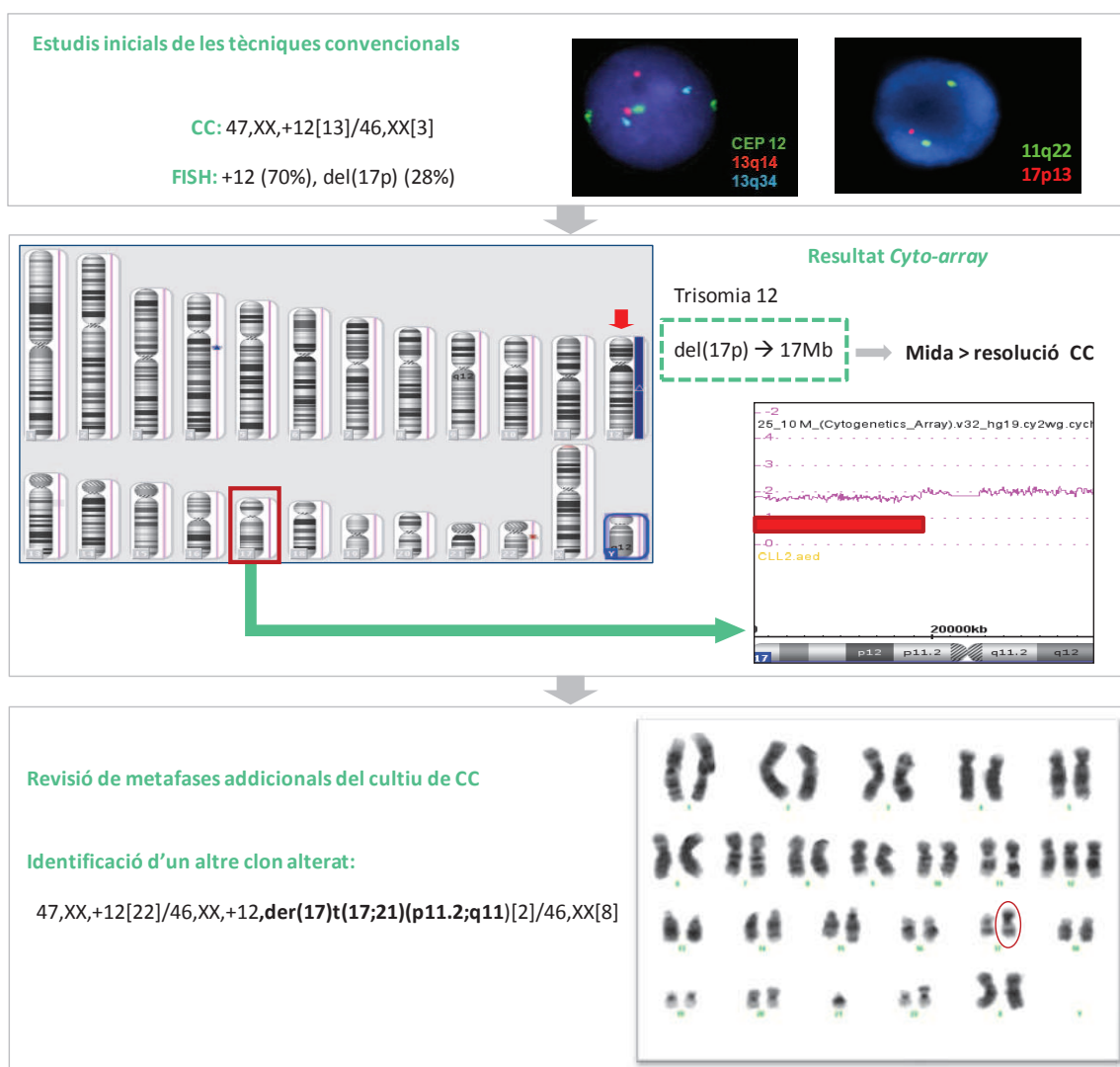


Figura S7

Exemple de la correcció del cariotip obtingut per citogenètica convencional de bandes G després de l'anàlisi d'arrays (II). Inicialment es va identificar una trisomia del cromosoma 12 per CC. L'estudi de FISH va confirmar la trisomia i també va permetre detectar una del(17p). Els resultats de *Cyto-array* van permetre establir la mida de la del(17p), que estava per sobre el límit de resolució de la CC. Davant aquesta discrepància, l'anàlisi de metafases addicionals va permetre identificar un clon minoritari que, a més de la trisomia 12, presentava un reordenament entre els cromosomes 17 i 21 que s'associava a la pèrdua de *TP53*.





## Discussió

Actualment s'accepta que les alteracions citogenètiques tenen un rol important en la patogènesi de la LLC. Les categories de risc citogenètic proposades per Döhner i col·laboradors (Döhner *et al*, 2000) són un dels factors pronòstics més importants en la LLC. No obstant, l'estratificació dels pacients es basa en la detecció de delecions a 11q, 13q o 17p, i de trisomia 12 per FISH, sense tenir en compte les característiques d'aquestes anomalies o la presència d'altres alteracions no incloses al panell de FISH. Així, es coneix que els grups pronòstics establerts en l'algorisme de Döhner són heterogenis, i que els pacients poden presentar un curs clínic variable en funció de les alteracions detectades per citogenètica convencional.

La primera part d'aquesta tesi es centra en la caracterització dels pacients amb delecions a la regió 13q14 [del(13q)]. La del(13q) és l'alteració més comú en LLC per FISH, s'observa en més del 50% de pacients, i s'associa a bon pronòstic quan és detectada com a única alteració utilitzant aquesta metodologia. Durant els últims anys s'ha descrit que aquells pacients amb del(13q) grans que inclouen el gen *RB1* o amb un alt percentatge de nuclis alterats per FISH s'associen a un pitjor curs clínic (Ouillette *et al*, 2008; Hernández *et al*, 2009; Mosca *et al*, 2010; Van Dyke *et al*, 2010; Dal bo *et al*, 2011; Ouillette *et al*, 2011a; Parker *et al*, 2011; Orlandi *et al*, 2013). D'altra banda, tot i que un 30% de les del(13q) són bial·lèliques, l'impacte pronòstic que suposa la pèrdua del segon al·lel de 13q14 és controvertit. En aquest sentit, al treball 1, s'han comparat les característiques clínic-biològiques dels pacients amb del(13q) monoal·lèlica i bial·lèlica, així com l'impacte clínic del percentatge de nuclis amb del(13q) per FISH, en la cohort més àmplia, fins al moment, de pacients amb LLC prèviament no tractats i amb del(13q) aïllada per FISH. Al **treball 2**, l'anàlisi s'ha centrat en l'impacte de la informació addicional que aporta l'estudi del cariotip als pacients amb del(13q), amb o sense altres alteracions per FISH. Així, s'han comparat les característiques clínic-biològiques dels pacients amb alteracions de 13q14 al cariotip, translocacions [t(13q)] o delecions intersticials [i-del(13q)], amb un grup de pacients amb del(13q) per FISH que no presentava alteracions en aquesta regió per citogenètica convencional [F-del(13q)].

La segona part de la tesi, es centra en l'aplicabilitat a la pràctica clínica de la tecnologia de *microarrays* genòmics per a l'estudi de guanys i pèrdues de material genètic en LLC. Estudis previs han demostrat la utilitat dels microarrays per a la detecció de les delecions recurrents en LLC, amb un grau de concordança amb els resultats de FISH acceptable, així com per a caracteritzar-ne la mida i identificar noves alteracions amb un rol potencialment important en la patogènesi de la malaltia (Schwaenen *et al*, 2004; Gunn *et al*, 2008; Kujawski *et al*, 2008; Gunnarson *et al*, 2010; O'Malley *et al*, 2011; Ouillette *et al*, 2011b; Edelmann *et al*, 2012). Al **treball 3** s'han presentat els resultats de l'anàlisi de microarrays en 70 pacients amb LLC i s'han comparat amb les alteracions identificades amb les tècniques utilitzades a la

rutina diagnòstica de la LLC, citogenètica convencional (CC) i FISH. És destacable que aquest treball inclou la sèrie més àmplia fins al moment amb dades de CC en la comparació, fet que és poc habitual en els estudis que recull la literatura (Tyybakinoja *et al*, 2007; Kolquist *et al*, 2011; O'Malley *et al*, 2011).



# 1. Característiques dels pacients amb LLC i deleció de 13q

## 1.1. Valor pronòstic de les característiques citogenètiques de la deleció de 13q aïllada per FISH

### 1.1.1. Impacte pronòstic del percentatge de nuclis amb deleció de 13q per FISH

Durant els darrers anys s'ha descrit que el percentatge de nuclis alterats per FISH modifica el bon pronòstic típicament associat a la detecció de del(13q) aïllada en LLC (Hernández *et al*, 2009; Dal Bo *et al*, 2011; Orlandi *et al*, 2013). Al treball 1 es va demostrar que el percentatge de nuclis amb del(13q) per FISH, independentment del número d'al·lèles de 13q delecionats, té un impacte significatiu en el pronòstic de la cohort de 627 pacients estudiada. El punt de tall amb major poder predictiu es va establir al 90%. Així, aquells pacient amb més del 90% de cèl·lules alterades per FISH s'associaven de forma significativa a una inferior incidència acumulada de tractament als cinc anys (TtFT) i a una supervivència global (SG) més curta. A més a més, en l'anàlisi multivariada, el percentatge de nuclis amb del(13q) mantenia la significança per a la TtFT. Els resultats obtinguts concorden amb la literatura, però el punt de tall establert és superior a tots els proposats anteriorment, que oscil·len entre el 65,5% i el 80% (Hernández *et al*, 2009; Van Dyke *et al*, 2010; Dal Bo *et al*, 2011; Orlandi *et al*, 2013) (Taula 6).

D'altra banda, s'ha demostrat que els clons amb del(13q) pateixen una expansió durant el cultiu de citogenètica convencional amb el mitogen TPA, i que aquesta comporta una major detecció de del(13q) per FISH en aquest material respecte a la mateixa mostra no cultivada (Delgado *et al*, 2010). Davant aquest fet és destacable que, mentre que els estudis previs analitzaven material no cultivat, gairebé la meitat dels resultats de FISH del nostre treball procedien d'anàlisis realitzades en material procedent d'un cultiu de sang perifèrica. Per a comprovar el possible biaix degut al tipus de mostra analitzada es van comparar els percentatges d'alteració obtinguts per FISH en les mostres procedents de cultiu i en aquelles que no havien estat cultivades, i no es van detectar diferències significatives en els percentatges de cèl·lules alterades. Així doncs, es va determinar que el 90% era un punt de tall vàlid i comparable amb els descrits prèviament. A més, al nostre estudi vam comprovar que, tot i que amb menor poder predictiu en la cohort analitzada, la significança estadística en el TtFT també es mantenia en aplicar els punts de tall descrits anteriorment. De fet, el percentatge de del(13q) identificada per FISH, tractat com a variable contínua, ha demostrat tenir un valor predictiu en el pronòstic de la LLC (Van Dyke *et al*, 2010; Orlandi *et al*, 2013).

El mecanisme molecular subjacent a la patogènesi de la deleció de 13q14, així com

les característiques biològiques que expliquin les diferències clíniques entre els pacients en funció dels percentatges de del(13q) per FISH, no han estat definits. No obstant, s'han publicat evidències moleculars que recolzen el comportament clínic més agressiu dels pacients amb nivells elevats de del(13q) observat al treball 1, així com als estudis previs. Una anàlisi de *microarrays* d'expressió gènica en pacients amb del(13q) va descriure un perfil d'expressió similar entre els pacients amb nivells baixos de del(13q) i els pacients amb resultat de FISH normal. Per contra, aquells amb més del 80% de del(13q) presentaven més de 3.000 gens diferencialment expressats, molts d'ells implicats en funcions cel·lulars d'importància reconeguda en la patogènesi de la malaltia, com són la via del BCR, o mecanismes d'apoptosi i supervivència cel·lular. A més a més, tenien algunes característiques biològiques similars als grups citogenètics de pitjor pronòstic, com són els pacients amb del(11q) o del(17p), amb els quals compartien moltes de les vies i miARN desregulats (Rodríguez *et al*, 2012b). Així doncs, els nostres resultats i les evidències descrites a la literatura demostren que la detecció de percentatges elevats de del(13q) per FISH no reflecteix únicament una major càrrega del clon alterat al pacient, sinó que pot ser un indicador d'una forma de la malaltia més activa, on el clon maligne tingui una capacitat proliferativa superior que s'associï a una pitjor evolució clínica del pacient. Per altra banda, malgrat que el punt de tall amb millor poder predictiu divergeix entre els estudis publicats, la detecció de percentatges elevats de deleció pot ser útil per estratificar el risc dels pacients amb del(13q) aïllada. De forma similar al que ha succeït amb les alteracions de 13q, recentment s'ha descrit l'impacte negatiu de la detecció d'un percentatge elevat de nuclis alterats en el pronòstic dels pacients amb deleció de 11q (detectada en més de 58%, Jain *et al*, 2015) o trisomia 12 (en més de 60%, González-Gascón *et al*, 2015). Aquestes troballes han aportat noves evidències que recolzen la importància de l'anàlisi de FISH per a l'estratificació pronòstica dels pacients amb LLC, no únicament quant a la detecció de determinades alteracions, sinó també en la quantificació de la proporció de cèl·lules portadores d'aquestes en cada pacient.

### 1.1.2. Impacte pronòstic de la pèrdua bial·lèlica de 13q

Respecte a la implicació clínica de la pèrdua del segon al·lel de 13q, al treball 2 no es van observar diferències significatives en les característiques al diagnòstic o l'evolució clínica dels pacients amb LLC i deleció de 13q monoal·lèlica (13qx1), bial·lèlica (13qx2) o en mosaic (13qM). Els nostres resultats concorden amb estudis previs que no van identificar cap associació entre la proporció de pacients que requeria tractament o el temps fins al primer tractament (TPT) i el número d'al·lèls de 13q delecionats (Van Dyke *et al*, 2010; Dal bo *et al*, 2011; Garg *et al*, 2012). D'altra

banda, alguns autors si que han descrit que el grup 13q<sub>x2</sub> inclou una major proporció de pacients en estadis de Rai o Binet avançats i que s'associa de forma significativa amb un TPT més curt, encara que només en l'anàlisi univariada (Chena *et al*, 2008; Hernández *et al*, 2009; Orlandi *et al*, 2013) (Taula 6).

D'altra banda, diversos autors han suggerit que les delecions bial·lèliques de 13q sorgeixen com a conseqüència de l'evolució clonal d'una pèrdua monoal·lèlica. Un treball de Chena i col·laboradors postulava que la coexistència de clons amb delecions monoal·lèliques i bial·lèliques en un mateix pacient era una prova d'evolució clonal. A més, va demostrar l'adquisició de clons que perdien el segon al·lel de 13q o el gen *RB1* mitjançant estudis de FISH seqüencials durant l'evolució de la malaltia (Chena *et al*, 2008). Altres autors, a més, han associat aquesta evolució clonal amb el comportament clínic més agressiu dels pacients 13q<sub>x2</sub> (Dewald *et al*, 2003) (Taula 6). Per tal d'estudiar l'evolució clonal a la nostra cohort ens vam centrar en el grup 13qM i, malgrat tenir una proporció de pacients amb mosaïcisme similar a la descrita a la literatura (Chena *et al*, 2008), les característiques dels clons 13q- coexistents en un mateix individu no van permetre discernir un possible mecanisme d'evolució clonal entre ells. No es va identificar predominança de cap dels clons, monoal·lèlic o bial·lèlic, al grup 13qM, fet que contrasta amb estudis previs que descrivien que el clon amb pèrdues monoal·lèliques era majoritari als pacients amb mosaic (Reddy *et al*, 2006; Chena *et al*, 2008). A més a més, el percentatge de nuclis de cada tipus identificat en un mateix pacient no diferia de forma significativa. D'altra banda, l'anàlisi dels 84 pacients amb estudis de FISH seqüencials va demostrar que, mentre vuit pacients perdien l'al·lel restant de 13q durant el curs de la malaltia, cap dels pacients canviava l'estat de 13q en el sentit invers, del grup 13q<sub>x2</sub> al 13q<sub>x1</sub>. Així doncs, els canvis en la del(13q) observats durant el seguiment dels pacients són compatibles amb la hipòtesi d'una possible evolució clonal en les delecions de 13q bial·lèliques.

Una altra característica diferencial que suggereix una major agressivitat en els pacients amb pèrdua bial·lèlica és la mediana en el percentatge de nuclis alterats per FISH, essent significativament superior en els pacients amb pèrdua bial·lèlica de 13q (72,5% al grup 13q<sub>x2</sub> i 80% al 13qM) respecte als pacients amb delecio monoal·lèlica de 13q (55%,  $P < 0,001$ ). Tot i que un treball previ també descrivia les diferències en la mida del clon alterat en funció del tipus de del(13q) (Orlandi *et al*, 2013), altres treballs no van detectar diferències significatives en el percentatge de nuclis 13q- (Dal bo *et al*, 2011; Garg *et al*, 2012) o en la proporció de pacients amb més del 80% de cèl·lules amb del(13q) a l'anàlisi de FISH (Hernández *et al*, 2009) (Taula 6). No obstant, la malignitat potencial associada a les diferències en la mida del clon alterat per FISH del nostre estudi no era suficient per generar diferències significatives en el curs clínic del grup 13q<sub>x1</sub>, 13q<sub>x2</sub> i 13qM.

D'altra banda, cal tenir en compte que la mida de les del(13q) és variable i, mentre que la regió mínima delecionada inclou *miR-15a* i *miR16-1*, s'han descrit pèrdues més àmplies que afecten també el gen *RB1* i s'associen a menors TPT i supervivència global (Parker *et al*, 2011; Dal Bo *et al*, 2011; Mian *et al*, 2012). Assumint que, com s'ha descrit a la literatura, les delecions bial·lèliques de 13q són típicament petites i no inclouen *RB1* (Ouillet *et al*, 2008), es pot hipotetitzar que la pitjor evolució associada a la pèrdua del segon al·lel és compensada per l'impacte pronòstic que té la mida de la delecio (major taxa de pèrdues de *RB1* en del(13q) monoal·lèliques). També cal destacar que s'han descrit altres mecanismes epigenètics que podrien inactivar la còpia de 13q14 no delecionada al grup 13qx1, com són la metilació de les illes CpG de l'ADN (Mertens *et al*, 2006) o la desacetilació d'histones (Sampath *et al*, 2012).

En conclusió, segons els nostre treball i el que s'ha descrit a la literatura, el fet de detectar un mediana de nuclis alterats més elevada al grup 13qx2 i 13qM, i l'evolució clonal demostrada en algunes delecions bial·lèliques, suggereixen que aquestes tenen un major potencial de malignitat que les delecions monoal·lèliques. No obstant, l'efecte de les mateixes no és suficient per a generar diferències significatives en el pronòstic dels grups 13qx1, 13qx2 i 13qM analitzats en aquesta tesi.

Taula 6. Resum de les principals publicacions d'anàlisis de l'impacte pronòstic de la deleció del(13q) als pacients amb LLC.

Publicació	N	Tècnica utilitzada	Percentatge 13q- per FISH		Deleció de RB1		Pèrdua bial·lèlia de 13q14	
			Valor Pronòstic	Comentaris	Valor Pronòstic	Comentaris	Valor Pronòstic	Comentaris
Dewald <i>et al</i> , 2003	38	FISH	NA		NA		Sí	- Sorgeix com a evolució clonal: 9 pacients amb pèrdua D13S319 i RB1 independents - Associat a LLC més agressiva (no realitzen anàlisis de supervivència)
Reddy <i>et al</i> , 2006	160	FISH	NA		NA		NA	- Sorgeix com a evolució clonal: predominàcia del clon 13qx1 als mosaics - Suggereixen impacte pronòstic, però no l'anàlitzzen
Chena <i>et al</i> , 2008	55	FISH <i>Microarrays</i> genòmics	NA		NA		Sí	- Sorgeix com a evolució clonal: canvi de 13qx1 a 13qx2 en FISH seqüencials - Major incidència en estadis avançats i pacients amb malaltia progressiva - Menor TPT
Ouillette <i>et al</i> , 2008	91	FISH	NA				NA	
Hernández <i>et al</i> , 2009	109	FISH	Sí	- Punt de tall 80% - Menor TPT i SG	NA		Sí	- Proporció de 13qx2 independent del percentatge de FISH - Menor TPT
Van Dyke <i>et al</i> , 2010	323	FISH	Sí	- Punt de tall 65,5% - Menor TPT - Major taxa pacients tractats als 5 anys	NA		No	- TPT i SG similars

Publicació	N	Tècnica utilitzada	Valor Pronòstic	Comentaris	Valor Pronòstic	Comentaris	Valor Pronòstic	Comentaris
Dal bo <i>et al.</i> , 2011	342	FISH	Sí	- Punt de tall 70% - Menor TPT		- Menor TPT i SG - Significatiu si <70% de del(13q) per FISH - Pèrdua de RB1 sempre monoal·lèlica	No	- Proporció de 13q2 independent del percentatge de FISH - TPT similars
Garg <i>et al.</i> , 2012	176	FISH	No	- Percentatges superiors en pacients tractats - No significància estadística	NA		No	- TPT no assolit en cap dels grups
Ouillette <i>et al.</i> , 2011a	132	FISH Microarrays genòmics	NA			- Menor SG - Pèrdua de RB1 bial·lèliques (5% pacients)	NA	
Parker <i>et al.</i> , 2011	132	FISH Microarrays genòmics	NA			- Major incidència en pacients que progressen o són tractats. - Major risc de progressió	NA	
Mian <i>et al.</i> , 2012	95	FISH Microarrays genòmics	NA			- Menor TPT i SG	NA	
Orlandi <i>et al.</i> , 2013	140	FISH	Sí	- 3 grups pronòstics (<50%, 50-69%, ≥70%) - Menor TPT - Major taxa de pacients tractats als 5 anys		- No efecte en el TPT - Pèrdua de RB1 sempre monoal·lèlica	Sí	- Major incidència en estadis Binet C - Associada a major taxa de deleció de RB1 - Associada a percentatges de del(13q) per FISH superiors - Menor supervivència lliure de progressió
Puiggrós <i>et al.</i> , 2013	627	FISH	Sí	- Punt de tall 90% - Menor TPT	NA		Sí	- Sorgeix com a evolució clonal - Associada a percentatges de del(13q) per FISH superiors - No diferències en TPT

\* Als treballs on la cohort estudiada no estava constituïda únicament per pacients amb del(13q), s'indica únicament el número de pacients amb del(13q) caracteritzats.

Abreviacions: NA, no analitzat; TPT: temps fins al primer tractament; SG: supervivència global; 13q1: deleció 13q monoal·lèlica; 13q2: deleció 13q bial·lèlica

## 1.2. Valor pronòstic de la detecció d'anomalies a la regió 13q14 per citogenètica convencional

La del(13q) aïllada per FISH es considera un marcador de bon pronòstic en LLC, però l'impacte clínic que pot tenir el mecanisme pel qual es genera la pèrdua de 13q (deleció intersticial o translocació) o la presència d'alteracions addicionals als pacients amb del(13q) no ha estat definit. En aquest sentit, el treball 2 pretén obtenir una visió més àmplia de la del(13q) en LLC i estudia les característiques clínic-biològiques dels pacients amb LLC que presenten alteracions de la regió 13q14 detectades per CC o FISH, relacionant-les amb altres alteracions concomitants detectades al cariotip o amb les altres sondes incloses al panell de FISH de la LLC.

### 1.2.1. Translocacions de 13q14: característiques, cariotip i associació a deleció 13q

La LLC és una neoplàsia que no es caracteritza per la presència de cap translocació cromosòmica específica, però un 32-42% de pacients presenta alguna translocació al cariotip (Mayr *et al*, 2006; Van Den Neste *et al*, 2007; Baliakas *et al*, 2014). Tot i que les translocacions que afecten la banda cromosòmica 13q14 són recurrents en LLC, els treballs publicats caracteritzen sèries reduïdes de pacients amb t(13q). El primer estudi publicat referent a aquestes translocacions descrivia 30 pacients amb LLC i t(13q), però limitava la caracterització de la regió 13q14 per FISH a només set casos (Gardiner *et al*, 1997). En estudis posteriors, tot i que es realitzava una anàlisi més exhaustiva de la del(13q) per FISH, el nombre de pacients inclosos era més reduït (Struski *et al*, 2007; Hrubá *et al*, 2012) (Taula 7).

Al treball 2 d'aquesta tesi doctoral, vam descriure i estudiar per FISH 25 pacients amb LLC i t(13q). És destacable que cap de les translocacions identificades al grup t(13q) era recurrent, i que la complexitat cariotípica era molt variable entre pacients. Per comparar la complexitat cariotípica dels tres grups definits al treball [t(13q), i-del(13q) i F-del(13q)] cal tenir en compte que aquest treball presenta una limitació inherent a l'aplicació de la CC en LLC, tècnica en la qual l'obtenció de metafases alterades es veu limitada per la capacitat mitòtica de les cèl·lules leucèmiques *in vitro*. En aquest sentit, un 72% (213/295) dels pacients del grup F-del(13q) presentava un cariotip normal i, sense haver aplicat tècniques complementàries com els *microarrays* genòmics, no és possible discernir si aquells pacients eren portadors d'una del(13q) de mida petita, per sota la resolució de la CC, o si en realitat es tractava de pacients amb del(13q) més grans, o amb altres alteracions addicionals, presents en un clon que no s'havia dividit durant el cultiu de CC. No obstant, es

va considerar que el grup F-del(13q) era prou gran com per minimitzar el possible efecte que això pugués tenir, i es van tractar tots els pacients amb cariotip normal com si únicament tinguessin alteracions submicroscòpiques, com la del(13q), no detectables per CC. Per a la comparació de la complexitat cariotípica dels tres grups, és destacable que al grup F-del(13q) es van considerar únicament els 82 pacients que presentaven alguna alteració al cariotip. En aquest context, la mediana d'alteracions no diferia significativament entre els grups t(13q), i-del(13q) i F-del(13q), i en tots ells s'observava prop d'un 20% de cariotips complexes.

Respecte a l'associació de la translocació amb pèrdua de material genètic al punt de trencament, es va demostrar deleció del *locus* D13S319 a tots els pacients t(13q). Els nostres resultats concorden amb els treballs previs que demostraven pèrdues a 13q14 associades a translocació. De fet, s'ha descrit que un 10% dels pacients amb del(13q) per FISH tenen un cariotip alterat que inclou una t(13q) (Gardiner *et al*, 1997; Hrubá *et al*, 2012). No obstant, cal tenir present que també s'han descrit alguns casos minoritaris on la detecció de la translocació no comporta del(13q) concomitant (Taula 7). Aquest fet pot ser degut a la variabilitat en els punts de trencament del reordenament, és a dir, que siguin centromèrics o telomèrics a la regió de 13q14 estudiada per FISH i preservin el *locus* D13S319. D'altra banda, Struski i col·laboradors també van demostrar, en estudis de FISH en metafase, que el punt de trencament de la translocació pot generar separació dels senyals d'hibridació per a *RB1* i D13S319 i preservar ambdós *loci* (Struski *et al*, 2007). L'associació entre translocacions i delecions en el punt de trencament també s'ha descrit en altres neoplàsies hematològiques, com ara pèrdues d'*ABL1*, a 9q34, en la leucèmia mieloide crònica amb t(9;22) o deleció d'*IGH* en limfoma fol·licular amb t(14;18) (Sinclair *et al*, 2000; Espinet *et al*, 2008). Globalment, tant els nostres resultats com els estudis previs demostren que les translocacions són un dels mecanismes de generació de del(13q) en LLC. El fet de no haver identificat una parella de reordenament recurrent, així com haver demostrat del(13q) en la gran majoria de pacients amb translocació, suggereix que el resultat de la translocació és la pèrdua d'un o més gens supressors de tumors a 13q14, en lloc de la generació d'un proto-oncogen com a conseqüència del reordenament (Gardiner *et al*, 1997; Struski *et al*, 2007).

## **1.2.2. Diferències entre els pacients amb alteracions de 13q14 per CC [t(13q) o i-del(13q)] i aquells amb deleció de 13q únicament per FISH [F-del(13q)]**

### **1.2.2.1. Característiques de la deleció 13q per FISH**

Un cop demostrada la presència de la deleció 13q associada a les translocacions



del grup t(13q), es va analitzar si aquestes delecions presentaven algun tret característic que permetés distingir-les dels altres grups amb pèrdua de 13q inclosos al treball 2 [i-del(13q) i F-del(13q)].

Pel que refereix al percentatge de nuclis alterats per FISH, malgrat que a la cohort estudiada la fracció de nuclis amb pèrdua de 13q era molt variable, es van identificar diferències significatives entre grups. Aquells pacients amb alteracions de 13q detectables al cariotip, ja fossin translocacions [grup t(13q)] o grans delecions intersticials [grup i-del(13q)], presentaven una mediana de nuclis alterats per FISH significativament superior a la dels pacients amb del(13q) detectada únicament per FISH [grup F-del(13q)]. Com s'ha discutit anteriorment, s'ha demostrat que una proporció elevada de cèl·lules alterades per FISH s'associa amb una forma més activa de la malaltia i a una major proliferació del clon maligne (Rodríguez *et al*, 2012a). Per tant, es podria hipotetitzar que els pacients dels grups t(13q) i i-del(13q) tindrien més cèl·lules 13q- amb un elevat potencial proliferatiu que hauria contribuït a la divisió del clon alterat durant el cultiu de CC i a la seva detecció.

Un altre factor que ha demostrat tenir cert impacte en les característiques clíniques dels pacients amb del(13q) és el nombre d'al·lells de 13q14 delecionats. En aquest sentit, la incidència de pèrdues bial·lèliques al grup t(13q) va ser significativament superior que la del grup i-del(13q) i F-del(13q) (40% *vs.* 11,3% i 14,9%, respectivament;  $P < 0,001$ ). Pel que refereix al grup t(13q), set dels onze pacients amb del(13q) bial·lèlica presentaven mosaïcisme de cèl·lules amb pèrdua monoal·lèlica i bial·lèlica. Desafortunadament, en aquests set pacients no va ser possible estudiar metafases en la hibridació de FISH per a definir el nombre d'al·lells delecionats al clon portador de la translocació. Per contra, als quatre pacients restants amb delecio bial·lèlica per FISH únicament es va detectar un clon, fet que permet assumir que la pèrdua del segon al·lel hauria tingut lloc com a conseqüència d'una delecio intersticial independent al cromosoma 13 no translocat. La detecció de del(13q) bial·lèliques en clons amb t(13q) s'ha descrit a la literatura. No obstant, Hrubá i col·laboradors van estudiar 13 pacients amb t(13q) i van poder demostrar que el 38% d'ells eren portadors de múltiples clons diferents, amb del(13q) intersticial i/o pèrdua associada a la t(13q), que coexistien però que podien tenir orígens clonals diferents (Hrubá *et al*, 2012) (Taula 7).

D'altra banda, al treball 2 també es va avaluar la possible inclusió del gen **RB1** en la delecio dels pacients t(13q), i en una representació de pacients dels grups i-del(13q) i F-del(13q). Respecte el grup t(13q), contràriament al resultat obtingut pel **locus** D13S319, únicament vuit pacients (32%) presentaven delecio del gen **RB1**. La literatura recull dos treballs que avaluen l'estat del gen **RB1** en les delecions associades a t(13q) en un número reduït de pacients, però els resultats que presen-

ten són divergents. Un estudi de Hrubá i col·laboradors suggeria que els pacients amb t(13q) s'associaven a una malaltia més agressiva, i que presentaven una incidència elevada de pèrdues de **RB1** (4/6, 67%) (Hrubá *et al*, 2012). En canvi, Struski i col·laboradors van identificar una taxa de pèrdues de **RB1** similar a la nostra (3/8 pacients, 38%) (Struski *et al*, 2007), que alhora és similar a la taxa del 20-25% descrita per a grans cohorts de pacients amb del(13q) no seleccionats (Ouillet *et al*, 2011a; Mian *et al*, 2012) (Taula 7). En referència al grup F-del(13q), que presentava delecions de 13q críptiques per CC, també es va detectar una taxa de pèrdua de **RB1** similar a les descrites a la literatura (31%). Per contra, és destacable que els pacients inclosos al grup i-del(13q), amb grans delecions detectables al cariotip, presentaven una incidència de pèrdua de **RB1** significativament superior als altres pacients (79%). Globalment, els nostres resultats suggereixen que, mentre que les t(13q) no s'associen a una major incidència de delecio de **RB1**, aquells pacients amb del(13q) prou grans com per ser identificades per CC freqüentment presenten pèrdua del gen **RB1**, que podria associar-se a un pitjor pronòstic.

Taula 7. Resum de les principals publicacions sobre les característiques de les t(13q) en LLC.

	Gardiner <i>et al</i> , 1997	Struski <i>et al</i> , 2007	Hrubá <i>et al</i> , 2012	Puiggros <i>et al</i> , 2014
N	30	10 (entre 17 neoplàsies de cèl·lules B madures)	5	25
Descripció de les anàlisis realitzades	Descripció del cariotip i característiques clíniques, anàlisi dels punts de tall per FISH en 7 pacients	Descripció punts de trencament per FISH	Descripció de 5 pacients amb coexistència de t(13q) i del(13q) intersticial	Descripció del cariotip i característiques clíniques, anàlisi D13S319 i <b>RB1</b> per FISH
Cariotip	- Múltiples parelles de reordenament - 6/30 pacients amb t(13q) complexes - Complexitat cariotip similar a i-del(13q)	- Múltiples parelles de reordenament	- Múltiples parelles de reordenament	- Múltiples parelles de reordenament - 20% cariotips complexos, similar als grups i-del(13q) i F-del(13q)

	Gardiner <i>et al</i> , 1997	Struski <i>et al</i> , 2007	Hruba <i>et al</i> , 2012	Puiggros <i>et al</i> , 2014
<b>Pèrdua de 13q associada a la t(13q)</b>	- Confirmada en 6/7 pacients (FISH amb YACs, baixa resolució) - Punt de trencament i mida de la del(13q) variable	- En 8/17 pacients - t(13q) sense del(13q): · Trencament distals o proximals a la RMD · Un cas entre <i>RB1</i> i D13S319 sense pèrdua material	NA	- Pèrdua de D13S319 confirmada a tots els pacients
<b>Percentatge de 13q- per FISH</b>	NA	NA	NA	- Similar al grup i-del(13q) - Superior al grup F-del(13q)
<b>Pèrdua bial·lèlia de 13q14</b>	- 2/7 13qx2 (29%) - Mida de la del(13q) en cada cromosoma diferent (esdeveniments independents)	NA	- 5/13 13qx2 (38%) - Delecions generades per mecanismes independents: coexistència de múltiples clons amb del(13q) diverses als pacients	- 10/25 13qx2 (40%) - Superior als grups i-del(13q) i F-del(13q)
<b>Deleció de <i>RB1</i></b>	NA	- 3/8 pacients amb del(13q) (38%)	- 4/6 pacients (67%) - Superior als clons detectats amb del(13q) intersticial (3/8; 38%)	- 8/25 pacients (32%)
<b>Pronòstic</b>	- No diferències significatives amb i-del(13q) [54 pacients]	NA	NA	- Similar al grup i-del(13q) [62 pacients] - TPT inferior al grup F-del(13q) [295 pacients]

Abreviacions: NA, no analitzat; t(13q): translocació de 13q; i-del(13q): deleció intersticial de 13q al cariotip; F-del(13q): deleció de 13q no detectada al cariotip; RMD: regió mínima delecionada; 13qx2: deleció 13q bial·lèlica; TPT: Temps fins al primer tractament

### 1.2.2.2. Concomitància d'altres alteracions genètiques amb valor pronòstic

A part de les alteracions observades per CC, al treball 2 també es va analitzar si els tres tipus d'alteracions cariotípiques a 13q14 (translocació, deleció intersticial detectable al cariotip o deleció críptica per CC) presentaven una incidència d'alteracions addicionals per FISH diferent. Malgrat que la taxa de detecció de del(11q) o trisomia 12 concomitants a la del(13q) va ser similar entre els grups t(13q), i-del(13q) i F-del(13q), és destacable la variabilitat observada en la detecció de pèrdues de 17p. La taxa de detecció de del(17p) als pacients amb deleció intersticial de 13q va ser similar a les freqüències descrites per la població de LLC general, va ser d'un 8,6% al grup i-del(13q) i d'un 7,2% al grup F-del(13q) (Döhner *et al*, 2000; Delgado *et al*, 2012). Contràriament, els pacients amb t(13q) presentaven una freqüència de del(17p) més elevada (37,5%) i significativament superior a la resta de grups. Cap dels estudis de la literatura ha descrit prèviament una major taxa de del(17p) als pacients amb t(13q), però té sentit assumir que l'elevada incidència de pèrdues del gen *TP53* en aquest grup de pacients genera un context d'instabilitat genètica que afavoreix els reordenaments cromosòmics. No obstant, com s'ha discutit anteriorment, aquesta elevada proporció de del(17p) al grup t(13q) no es tradueix en una taxa de detecció de cariotips complexes superior a la dels altres grups.

D'altra banda, també es van estudiar les mutacions dels gens *NOTCH1*, *SF3B1* i *MYD88* al grup t(13q). Aquestes mutacions tenen una incidència baixa en LLC, i cap dels estudis anteriors referents a les t(13q) havia analitzat aquest punt en aquest subgrup de pacients. En total, es van identificar mutacions de *NOTCH1* en dos pacients (11,8%), mentre que cap dels onze pacients estudiats mostrava alteracions a *SF3B1* i *MYD88*. Malgrat que el número de pacients de l'anàlisi mutacional era reduït, els nostres resultats concorden amb la incidència de mutacions descrita en LLC (Puente *et al*, 2011; Quesada *et al*, 2012), i suggereixen que les translocacions de 13q14 no s'associen específicament a cap d'aquestes mutacions.

### 1.2.2.3. Característiques clínico-biològiques al diagnòstic i evolució clínica

Un altre aspecte que es va analitzar al treball 2 va ser l'impacte que té el tipus d'alteracions cariotípiques de 13q14 sobre les característiques clínico-biològiques dels pacients amb LLC i del(13q). Respecte els paràmetres clínics i biològics al diagnòstic, les úniques diferències significatives van ser una expressió de ZAP-70 i una taxa de del(17p) més elevades al grup t(13q) que als pacients i-del(13q) o F-del(13q), amdós grups amb delecions intersticials de la regió 13q14. Quant a l'evolució clínica, és destacable que no es van observar diferències significatives

entre els dos grups de pacients que presentaven alteracions de 13q14 al cariotip [t(13q) i i-del(13q)]. En canvi, els grups t(13q) i i-del(13q) presentaven una major proporció de pacients que va requerir tractament durant el seguiment, així com una mediana de TPT significativament més curta, en comparació amb els pacients amb pèrdua de 13q14 identificada únicament per FISH [grup F-del(13q)]. A més a més, l'impacte pronòstic observat en termes de TPT es mantenia en l'anàlisi multivariada.

Donat que s'han observat diferències significatives en algunes característiques citogenètiques que tenen impacte pronòstic dels tres grups, és possible establir una hipòtesi que les relacioni amb la pitjor evolució clínica observada als pacients del grup t(13q) i i-del(13q). Pel que es refereix al grup t(13q), el principal tret diferencial és la presència d'un reordenament cromosòmic que afecta la regió 13q14. L'impacte pronòstic que tenen les translocacions en LLC ha estat motiu de controvèrsia a la literatura. Tot i que els estudis inicials suggerien que la presència de translocacions cromosòmiques s'associava a mal pronòstic (Mayr *et al*, 2006), els estudis posteriors restringien l'associació a un curs clínic més agressiu a aquelles translocacions que eren desequilibrades per CC o que es detectaven en un context de cariotip complex (Van Den Neste *et al*, 2007; Baliakas *et al*, 2014). La majoria de pacients amb t(13q) inclosos al treball 2 no presentaven aquestes característiques: la taxa de cariotips complexos era similar als altres dos grups d'estudi (20%) i, malgrat en totes elles es va demostrar pèrdua del *locus* D13S319 a 13q14 per FISH, a nivell de CC únicament un 16% de les translocacions (4/25) eren desequilibrades. Aquestes troballes suggereixen que la identificació de reordenaments de 13q14 *per se* no comporta un pitjor pronòstic als pacients amb LLC. No obstant, els pacients amb t(13q) presentaven una taxa de del(17p) concomitant superior als altres grups, així com una incidència de pèrdues bial·lèliques i un percentatge de nuclis 13q- per FISH significativament superior al grup F-del(13q). Respecte el grup i-del(13q), aquest estava constituït per pacients amb del(13q) prou grans com per ser identificades per CC, que freqüentment implicaven pèrdua del gen *RB1* i, a més, presentaven una mitjana de nuclis amb del(13q) per FISH significativament superior a la dels pacients F-del(13q). Com s'ha discutit anteriorment, tant la pèrdua de *RB1* com la detecció de percentatges de nuclis 13q- elevats o delecions bial·lèliques per FISH afavoreixen un pitjor pronòstic dels pacients amb pèrdues de 13q. Aquestes característiques, així com l'associació amb del(17p) concomitant observada al grup t(13q), contribueixen a que els pacients amb alteracions de 13q14 al cariotip [t(13q) o i-del(13q)] presentin a una evolució clínica pitjor que els pacients inclosos al grup F-del(13q) (Figura 18).

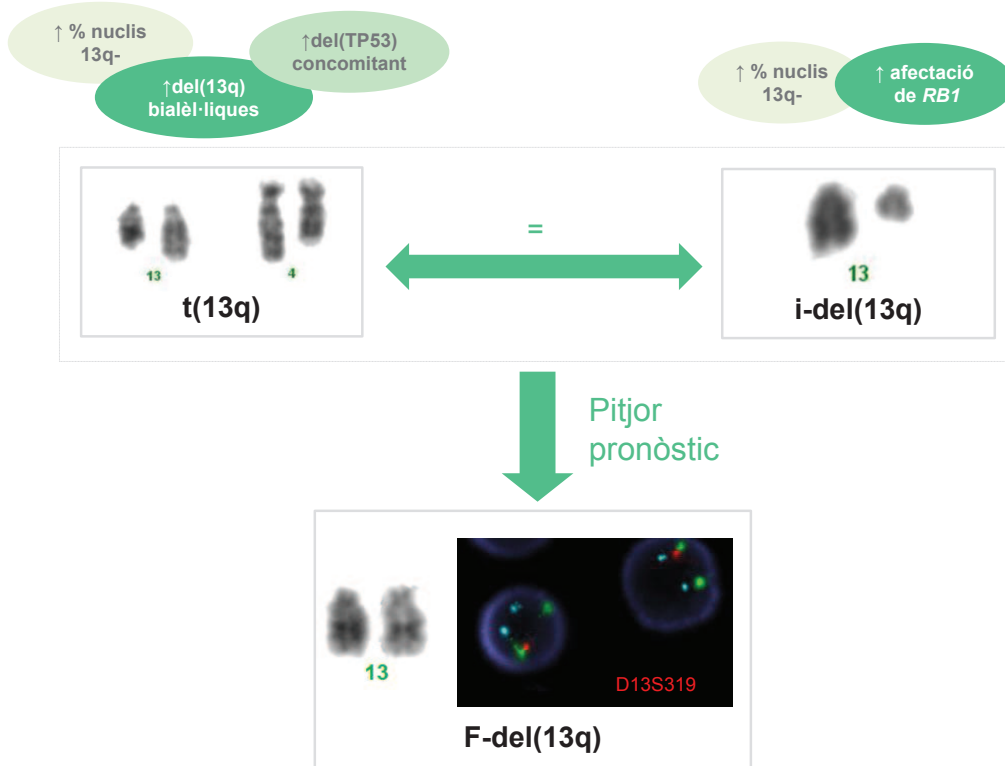


Figura 18. Esquema de les diferències al pronòstic dels grups estudiats al treball 2. Les esferes indiquen les característiques que potencien el mal pronòstic dels grups t(13q) i i-del(13q)

## 2. Utilitat de la tècnica de microarrays genòmics respecte la citogenètica convencional i el FISH per a la detecció d'alteracions cromosòmiques a la pràctica clínica de la LLC

### 2.1. Taxa de detecció d'anomalies de les diferents tècniques

El treball 3 comparava les alteracions identificades a 70 pacients amb LLC mitjançant les tècniques utilitzades a la rutina diagnòstica, CC i FISH, amb els resultats de l'anàlisi de *microarrays* genòmics (Cyto 2.7M i/o CytoScan, Affymetrix), als quals ens referim com a Cyto-arrays al treball. Pel que es refereix a la taxa de detecció d'anomalies, els Cyto-arrays permetien identificar un percentatge de casos alterats superior al de les tècniques convencionals (77,1% vs. 31,4% per la CC i 68,6% pel FISH). En part, aquesta major taxa de detecció s'atribuïa a la identificació de 12 LOH i 55 alteracions en el número de còpies de mida petita, que no són detectables per les tècniques convencionals. No obstant, l'aplicació dels cyto-arrays també va permetre la redefinició de quatre cariotips, així com la detecció d'alteracions grans, per sobre el límit de resolució de la CC (10Mb), en deu pacients que presentaven cariotip normal a l'anàlisi de CC. En aquests deu pacients, l'aplicació dels Cyto-arrays va facilitar la identificació d'anomalies que, d'altra banda, haurien estat emmascarades per la limitada taxa mitòtica que les cèl·lules neoplàsiques tenen en cultius basats en TPA (Dicker *et al*,2006; Haferlach *et al*,2007). En contraposició, en vuit pacients (11,4%) únicament es van identificar alteracions per CC. La majoria d'alteracions detectades únicament al cariotip eren reordenaments cromosòmics que no implicaven guanys o pèrdues d'ADN i, per tant, no són detectables per Cyto-arrays. No obstant, en tres pacients es va constatar una menor sensibilitat dels Cyto-arrays, que no van permetre identificar alteracions desequilibrades presents en una minoria de les metafases analitzades (Figura 19). De la mateixa manera, l'anàlisi per Cyto-arrays va obviar algunes de les alteracions detectades per FISH: dos pacients amb del(13q) (amb 10% i 47% dels nuclis alterats per FISH), un amb del(11q) (al 12% per FISH) i tres amb del(17p) (en 10%, 19% i 22% dels nuclis, respectivament).

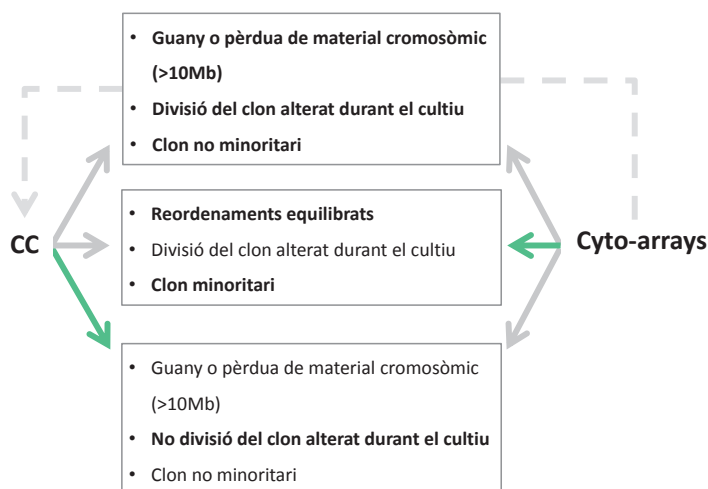


Figura 19. Factors que determinen la detecció d'alteracions grans (>10Mb) per CC i/o per Cyto-arrays. Les fletxes grises indiquen detecció; les verdes no detecció; la línia discontinua indica els casos on el resultat de Cyto-arrays permet corregir el cariotip.

El fet de no poder detectar algunes de les alteracions identificades en una baixa proporció de metafases o en percentatges reduïts de FISH posa de manifest la sensibilitat limitada dels Cyto-arrays. En aquest sentit, cal tenir present que al treball 3 es va utilitzar ADN procedent de diferents tipus de mostres (sang perifèrica total, cèl·lules mononucleades o cèl·lules CD19 seleccionades de sang perifèrica), i que aquest aspecte podria influir en la sensibilitat de la tècnica. Malgrat no haver fet comparacions dels resultats obtinguts en diferents mostres del mateix pacient, el treball 3 va demostrar la capacitat dels Cyto-arrays per detectar alteracions en mostres de sang perifèrica total. A més, la taxa de detecció d'alteracions entre els diferents tipus de mostres analitzades per Cyto-arrays no diferia de forma significativa. Aquest fet no és sorprenent, ja que la LLC presenta de forma característica una expansió de cèl·lules B anormals en sang perifèrica, que generalment representen percentatges alts de la cel·lularitat total. No obstant, una etapa de purificació per gradient de Ficoll podria millorar la taxa de detecció d'anomalies dels Cyto-arrays sense implicar un augment significatiu al cost o temps de processament. La selecció cel·lular és de gran importància en els pacients que presenten una representació baixa de cèl·lules tumorals a sang perifèrica (inferior al 30% dels limfòcits). En referència a aquests casos, els estudis immunofenotípics realitzats de rutina podrien ser molt útils per aportar aquesta informació. De fet, alguns autors ja han suggerit algorismes d'aplicació dels *microarrays* genòmics que es basen en la mida de la població tumoral detectada per citometria de flux (Gunn et al, 2008; Kay et al, 2010).

Globalment, malgrat que la major taxa de detecció d'anomalies va ser assolida mitjançant els Cyto-arrays, és imprescindible realitzar una anàlisi de l'impacte clínic que té la discordança observada en la detecció de certes anomalies mitjançant les diferents tècniques. L'avaluació de l'aplicabilitat dels *microarrays* genòmics a la pràctica clínica es desenvolupa als següents apartats de la discussió.

## 2.2. Detecció d'alteracions recurrents en LLC incloses al panell de FISH de rutina

La taxa de detecció d'alteracions recurrents amb valor pronòstic definit en LLC (del(13q), del(11q), del(17p) i trisomia 12) va ser menor a l'anàlisi per Cyto-arrays respecte a la de FISH, tot i que les diferències no eren estadísticament significatives (62,8% vs 68,6%;  $P=0,594$ ). La concordança global entre ambdues tècniques va ser del 91,4% i és comparable a les descrites a la literatura, que oscil·len entre el 79 i el 98% dels resultats (Tyybakinoja *et al*, 2007; Gunn *et al*, 2008; Ouillette *et al*, 2008; Gunnarson *et al*, 2010; O'Malley *et al*, 2011). En tots els casos amb resultat discordant, la discrepància va ser deguda a una menor sensibilitat de la tècnica



de Cyto-arrays respecte al FISH. En aquest punt, cal tenir present que el tipus de mostra utilitzat en les anàlisis de FISH i Cyto-arrays era diferent. Mentre l'ADN hibridat als Cyto-arrays procedia de mostres de sang perifèrica total o cèl·lules CD19+ seleccionades de sang perifèrica, tots els estudis de FISH es van realitzar en material procedent del cultiu de citogenètica convencional, que es realitza sobre sang perifèrica però precisament degut al fet que les cèl·lules estan cultivades, pot haver-hi expansions (mínimes) d'algun tipus cel·lular per sobre de la resta. Per establir el límit de sensibilitat dels Cyto-arrays es va avaluar el percentatge d'alteració per FISH dels casos discordants. No obstant, el punt de tall establert pot tenir un biaix degut al tipus de la mostra analitzada en cada tècnica, així com per l'efecte que el cultiu pot causar al percentatge de nuclis alterats per FISH, com s'acaba de comentar (ex. expansió del clon 13q- durant el cultiu (Delgado *et al*, 2010)). Malgrat aquesta limitació inherent al disseny de l'estudi, es va establir que el límit de sensibilitat dels Cyto-arrays trobava al 25% de nuclis alterats per FISH, i coincideix amb el 20-30% descrit en la majoria d'estudis realitzats amb altres plataformes de *microarrays* genòmics (Schwaenenet *et al*, 2004; Kujawski *et al*, 2008; Ouillette *et al*, 2011b). D'altra banda, algunes de les alteracions identificades al treball 3 representaven menys del 25% de nuclis per FISH, essent majoritàriament trisomies del cromosoma 12 detectades a nivell visual. Alguns autors també han descrit excepcions en les quals els *microarrays* eren capaços de detectar alteracions de mida gran (per exemple, guanys de cromosomes sencers) presents en fins al 5-10% de nuclis, per sota del límit de sensibilitat establert (Schultz *et al*, 2011) (Taula 8).

Pel que fa a l'impacte clínic de les discrepàncies observades, dues de les anomalies no identificades per Cyto-arrays eren del(13q). Els pacients amb del(13q) s'han associat de forma general a un pronòstic favorable, per tant aquesta omisió probablement no afectaria negativament a les decisions terapèutiques a prendre en aquests casos. Per contra, l'anàlisi feta per Cyto-arrays no va detectar anomalies en quatre pacients que presentaven del(11q) o del(17p) amb una afectació de menys del 20% per FISH. Respecte als casos amb del(17p), la literatura recull diversos treballs que avaluen el punt de tall que defineix el pronòstic advers associat a aquesta anomalia, i que l'estableixen a partir del 10-25% de nuclis alterats per FISH (Catovsky *et al*, 2007; Tam *et al*, 2009; Oscier *et al*, 2010; Delgado *et al*, 2012). No obstant, treballs més recents que analitzen els mecanismes d'evolució clonal en LLC han posat de manifest la rellevància clínic que tenen els clons amb del(17p) o TP53, fins i tot si aquest són molt minoritaris. Rossi i col·laboradors van demostrar que alguns clons amb alteracions de TP53, que eren únicament detectables amb tècniques de seqüenciació d'alta sensibilitat, són capaços d'expandir-se durant el transcurs de la malaltia i permeten predir resistència al tractament quimioteràpic (Rossi *et al*, 2014). Pel que fa als pacients del(11q), recentment s'ha descrit que el mal pronòstic associat a l'alteració es pot estratificar en funció del percentatge de

nuclis 11q- per FISH, i s'ha proposat el 58% com a punt de tall que defineix un pitjor curs clínic (Jain *et al*, 2015). D'altra banda, s'ha demostrat que les pèrdues i/o mutacions d'ATM o BIRC3 s'associen a quimioresfractarietat als tractaments estàndard (Rose-Zerilli *et al*, 2014). Així, encara que no s'hagi demostrat una relació clara entre l'expansió de clons minoritaris amb del(11q) i la progressió de la malaltia, és factible assumir que aquests poden tenir un paper important en l'evolució clonal descrita als pacients que requereixen tractament (Sutton *et al*, 2015).

En conclusió, malgrat el número d'alteracions no detectades per Cyto-arrays és reduït i correspon a clons minoritaris dels pacients, les publicacions recents en aquest sentit suggereixen la rellevància clínica que aquestes discordances poden tenir en pacients portadors d'alteracions de mal pronòstic, especialment als pacients amb pèrdua de TP53.

D'altra banda, a diferència de l'anàlisi per FISH, l'aplicació dels Cyto-arrays, a més de detectar les alteracions recurrents en LLC, ofereix la possibilitat de definir-ne la mida. Una millor caracterització de les delecions pot tenir una repercussió en el seguiment clínic dels pacients amb pèrdues de 13q. Així, l'aplicació dels Cyto-arrays va permetre distingir les del(13q) grans que inclouen el gen RB1 (13 pacients), que s'associen a un curs clínic més agressiu, d'aquelles pèrdues petites que únicament afecten la regió mínima delecionada amb els gens DLEU2/MIR15A/MIR16-1 (21 pacients, incloent totes les pèrdues bial·lèliques) (Dal Bo *et al*, 2011; Parker *et al*, 2011). A més a més, tot i que no es va identificar cap cas al treball 3, els *microarrays* genòmics també ofereixen la possibilitat de detectar algunes alteracions de mal pronòstic obviades a l'anàlisi de FISH. En aquest sentit, Edelmann i col·laboradors van descriure la detecció per *microarrays* d'algunes del(11q) que incloïen el gen ATM, però només implicaven de forma parcial la sonda de FISH i no eren detectades per aquesta metodologia (Edelmann *et al*, 2012).

### 2.3. Detecció d'altres alteracions no incloses al panell de FISH de rutina

Un dels avantatges dels Cyto-arrays respecte l'anàlisi per FISH és que ofereixen la possibilitat d'obtenir una visió global del genoma. En aquest sentit, l'anàlisi per Cyto-arrays realitzat al treball 3 va permetre identificar alteracions no incloses al panell de FISH de rutina en un 48,6% dels pacients analitzats (34/70). Aquestes anomalies estaven distribuïdes al llarg de tots els cromosomes i tenien una mida molt variable. Quant al tipus d'alteració, la detecció de pèrdues va ser superior a la de guanys (78% vs.22%), fet que concorda amb el tipus d'alteracions identificades en treballs previs d'anàlisis de *microarrays* genòmics (Gunnarsson *et al*, 2011; Edelmann *et al*, 2012).

Pel que es refereix a l'impacte pronòstic que la detecció d'aquestes alteracions pot tenir, diversos autors han demostrat una associació entre la complexitat detectada per *microarrays* amb TPT menors, pitjor resposta als tractaments convencionals i supervivència global més curta (Kujawski *et al*, 2003; Gunnarsson *et al*, 2010; Kay *et al*, 2010; Gunnarsson *et al*, 2011; Ouillette *et al*, 2011b) (Taula 8). Els criteris establerts per a definir el grau de complexitat que s'associa a pitjor pronòstic són molt diversos, però tots ells es basen en el número d'alteracions identificades o en el sumatori de la mida de totes les alteracions detectades per *microarrays*. En la cohort estudiada en aquesta tesi, 33 pacients (47%) presentaven més de dues alteracions a l'anàlisi de Cyto-arrays i 15 dels pacients analitzats (21%) presentaven almenys una alteració gran (>10 Mb). No obstant, no va ser possible demostrar cap associació entre la complexitat genòmica identificada per Cyto-arrays i la progressió de la malaltia amb necessitat de tractament (13/70 pacients) o la supervivència global (únicament 4/70 van morir) (dades no incloses a l'article). Tot i que no es va validar el valor pronòstic de la complexitat detectada per *microarrays* genòmics descrit a la literatura, cal tenir en compte que l'absència de significació estadística observada pot ser deguda a la mida reduïda de la cohort, de només 70 pacients, així com a un de temps de seguiment insuficient (mediana propera als quatre anys) per a un grup de pacients majoritàriament en estadis inicials (88% Binet A).

D'altra banda, els estudis de *microarrays* genòmics realitzats en LLC han posat de manifest la recurrència d'alteracions, algunes d'elles no detectables per CC, que no estan incloses al panell clàssic de FISH i que s'associen a un pronòstic desfavorable. Una d'aquestes és el guany de 2p que implica el gen *MYCN*, identificat en dos dels pacients inclosos al treball 3 que presentaven del(11q) concomitant. L'associació entre les pèrdues de 11q i els guanys a 2p s'ha descrit prèviament però, contràriament als treballs previs (Schwaenen *et al*, 2004; Chapiro *et al*, 2010; Gunnarsson *et al*, 2010; Rinaldi *et al*, 2011), en el nostre estudi no es va demostrar un pitjor pronòstic en cap dels dos pacients amb aquesta alteració. Les alteracions del cromosoma 8 (pèrdues de 8p i guanys de 8q) també s'han proposat com a marcadors de mal pronòstic en LLC i, malgrat tenir una incidència baixa en la població general de pacients amb LLC, la freqüència d'alteracions a 8p i 8q augmenta dràsticament en pacients amb del(17p) (Forconi *et al*, 2008; Rinaldi *et al*, 2011). Tres dels pacients inclosos al treball 3 presentaven guanys a 8q i, de forma destacable, en cap d'ells es va evidenciar coexistència amb pèrdues de 17p (únicament un pacient amb del(13q) i un amb trisomia 12). L'únic d'aquests pacients que va requerir tractament durant el transcurs del treball 3 presentava guany de la regió 8q com a conseqüència de la formació d'un isocromosoma 8q, i presentava quatre alteracions addicionals no incloses al panell de FISH. Pel que fa a la resta d'alteracions identificades a l'anàlisi de Cyto-arrays, cap d'elles s'ha proposat com a marcador pronòstic en LLC als treballs publicats fins al moment a la bibliografia.

Taula 8. Resum de les principals publicacions d'anàlisi per *microarrays* genòmics en LLC. La literatura inclou més de 40 publicacions que analitzen pacients amb LLC mitjançant plataformes diverses de *microarrays*, la taula 8 únicament resumeix els resultats descrits als treballs que han analitzat cohorts àmplies, amb un mínim de 100 pacients.

Publicació	N	Tipus de <i>microarray</i>	Mostra analitzada	Concordança amb el FISH	Alteracions recurrents no detect	Comentaris generals
Schwaened <i>et al</i> , 2004	106	Arrays d'HGC (sondes de BACs/PACs)	Cèl·lules mononucleades de SP/MO	100% per FISH >53% per FISH 33-53%	No	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Descriuen guanys a 2p24 recurrents (<i>MYCN</i>)</li> <li>&gt; Les sondes de BACs ofereixen resolució limitada, i no permeten definir la mida concreta de les alteracions detectades</li> </ul>
Gunn <i>et al</i> , 2008	174	Arrays d'HGC (sondes de BACs)	SP	96% (N=48 pacients) Discordances en del(13q) <30% per FISH	Detecció de 2 del(13q) criptiques per FISH (~1Mb)	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; 96% dels pacients presenta alteracions per FISH i/o <i>microarrays</i></li> <li>&gt; Apliquen <i>microarrays</i> d'oligonucleòtids per confirmar punts de trençament en algunes alteracions identificades amb <i>microarray</i> de BACs (resolució de 2,5Mb)</li> <li>&gt; Suggereixen aplicar <i>microarrays</i> si &gt;30% de cèl·lules tumorals i procedir a fer FISH en cas de no detectar alteracions associades a pronòstic</li> </ul>
Kujawski <i>et al</i> , 2008	178	Arrays de SNPs	Cèl·lules CD19+	85-100% segons sonda Major grau de discordances en alteracions <25% per FISH	No	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Defineixen dues escales de complexitat genòmica per <i>microarrays</i>, basades en el número d'alteracions o de pèrdues, que té valor predictiu significatiu pel TPT</li> </ul>
Gunn <i>et al</i> , 2009a	187	Arrays d'HGC (sondes de BACs)	SP	N.R. Freqüències d'alteracions recurrents similars a les descrites	N.R.	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Descriuen deleccions submicroscòpiques a 22q11 (15% pacients)</li> <li>&gt; Proposen el gen <i>PRAME</i> com a responsable de la patogènesi d'aquestes alteracions (expressió disminuïda per QRT-PCR, no detecten diferències clíniques significatives als pacients amb l'alteració)</li> </ul>
Gunn <i>et al</i> , 2009b	190	Arrays d'HGC (sondes de BACs)	SP	N.R.	Descriuen 4 del(11q) atípiques, que no inclouen ATM i no són detectables a l'anàlisi de FISH	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Suggereixen que la patogènesi de la del(11q) no és deguda a un únic gen, sinó que es deu a l'alteració que pot afectar varis gens que regulen el cicle cel·lular</li> <li>&gt; Proposen analitzar l'evolució dels pacients amb del(11q) que no inclouen ATM, per valorar-ne la importància d'incorporar aquestes alteracions identificables per <i>microarrays</i> als algorismes pronòstics de la LLC</li> <li>&gt; Defensen la importància d'obtenir una visió global del genoma, que no és possible amb l'anàlisi per FISH</li> </ul>
Sargent <i>et al</i> , 2009	100	Arrays d'HGC (sondes d'oligonucleòtids)	SP/MO	89% Discordances en alteracions en 10-25% per FISH	No	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Suggereixen que l'aplicació dels <i>microarrays</i> és vàlida per a la pràctica clínica, però en restringeixen l'ús a mostres amb un mínim del 25% de població tumoral per citometria de flux</li> </ul>

Publicació	N	Tipus de <i>microarray</i>	Mostra analitzada	Concordança amb el FISH	Alteracions recurrents no detect	Comentaris generals
Chapiro <i>et al</i> , 2010	104	Arrays d'HGC (sondes d'oligonucleòtids)	SP/MO	100% per FISH >30% Menor si FISH <30%	N.R.	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Estudi centrat en pacients amb LLC en estadis avançats</li> <li>&gt; Descriuen guanys a 2p (28% pacients), que inclouen els gens <i>MYCN</i>, <i>MSH2</i> i <i>REL</i></li> <li>&gt; Guany a 2p associat a estadis avançats i complexitat cariotípica, pot ser un esdeveniment secundari important en la patogènesi de la malaltia</li> </ul>
Gunnarsson <i>et al</i> , 2009	203	Arrays de SNPs	SP (totes amb >70% cèl·lula tumoral)	N.R.	N.R.	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Descriuen associació entre els guanys a 2p i les del(11q)</li> <li>&gt; Descriuen que el número d'alteracions grans (&gt;5Mb) té poder predictiu en el pronòstic</li> <li>&gt; Els casos amb més alteracions tenen una alta incidència de del(11q) i del(17p)</li> </ul>
Gunnarsson <i>et al</i> , 2011	369	Arrays de SNPs	SP	N.R.	N.R.	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Demostren impacte pronòstic de la mida de la del(13q) detectada i de la complexitat genòmica identificada per <i>microarrays</i> (alteracions &gt;5Mb)</li> <li>&gt; Identifiquen evolució clonal en mostres seqüencials, majoritàriament adquisició d'alteracions incloses al panell de FISH, però també altres identificables només per <i>microarrays</i></li> </ul>
Ouillette <i>et al</i> , 2011	255	Arrays de SNPs	Cèl·lules CD19+	Variable segons sonda - 98-100% per FISH >25% - 73-92% per FISH <25%	N.R.	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Complexitat detectada (&gt;2-3 alteracions) s'associa a major freqüència de mutacions a <i>TP53</i> i pitjor pronòstic</li> <li>&gt; El número d'alteracions detectades per <i>arrays</i> té impacte en el TPFT i supervivència global; també permet estratificar el pronòstic dels pacients amb del(11q) i del(17p)</li> </ul>
Rinaldi <i>et al</i> , 2011	323	Arrays de SNPs	SP (totes amb >60% cèl·lula tumoral)	N.R.	N.R.	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Defineixen 8 alteracions que s'associen de forma significativa pronòstic advers: guany a 2p25.3-p22.3 (<i>MYCN</i>), 2p22.3, 2p16.2-p14 (<i>REL</i>), 8q23.3-q24.3 (<i>MYC</i>), i pèrdues afectant les bandes 8p23.1-p21.2, 8p21.2, i el locus <i>TP53</i></li> </ul>
Brown <i>et al</i> , 2012	161	Arrays de SNPs	Cèl·lules mononucleades de SP/Cèl·lules CD19+	N.R.	N.R.	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Descriuen guanys 3q26.32 (<i>PI3KCA</i>) i a 8q24 (<i>MYC</i>), i pèrdues a 8p, que s'associen a pacients amb malaltia més agressiva que requereixen tractament</li> <li>&gt; El número d'alteracions detectades per <i>arrays</i> (<math>\geq 2</math>) s'associa a un menor TPT; tant en la cohort global com als pacients sense del(11q) o del(17p)</li> <li>&gt; La mediana d'alteracions als pacients amb del(11q) o del(17p) és superior a la resta de pacients</li> </ul>

Publicació	N	Tipus de <i>microarray</i>	Mostra analitzada	Concordança amb el FISH	Alteracions recurrents no detect	Comentaris generals
Edelmann <i>et al</i> , 2012	353	Arrays de SNPs	Cèl·lules CD19+	100%	Identifiquen 2 del(13q) i 3 del(11q, són de mida inferior a la sonda FISH o minoritàries, detectades al fer selecció de les cèl·lules tumorals	> Descriuen noves microdeleccions a 15q15.1 (MCA) (4% de pacients), delecions a 10q24 (NF1KB2) (2%) i a 18p (3%), cap d'elles s'associa a diferències significatives en l'evolució clínica > Identifiquen cromotripsis (10 o més canvis en el número de còpies en un cromosoma individual) en 7/353 pacients (20%). S'associa a /GHV no mutat i alteracions de mal pronòstic per FISH, i a menor supervivència lliure de progressió o supervivència global
Mian <i>et al</i> , 2013	329	Arrays de SNPs	SP (totes amb >60% cèl·lula tumoral)	84-97% segons sonda de FISH	N.R.	> Un 22% dels pacients té almenys una alteració de >5Mb, associat a menor TPT > Únicament detecten 5/10 casos amb <40% de del(17p) per FISH > Les discordances en la detecció d'alteracions recurrents amb valor pronòstic són significatives: tant l'estratificació pronòstica basada en FISH com en <i>microarrays</i> és significativa > La menor sensibilitat dels <i>microarrays</i> no permet completa substitució del FISH. Suggerixen algorisme: Anàlisi inicial per <i>microarrays</i> , si no es detecta del(17p) procedir a l'anàlisi de TP53 per FISH, única alteració amb repercussió al tractament
Houldsworth <i>et al</i> , 2014	288	Arrays d'HGC (sondes d'oligonucleòtids)	SP/MO/ Cèl·lules mononucleades de SP/Cèl·lules CD19+	93,4% si >25% per FISH	N.R.	> Estableixen grups pronòstics a partir de diferents alteracions, que tenen impacte significatiu en TPT i supervivència global: - Mal pronòstic: 11q- o 17p- o algun 2p+, 3q+, 8q+, 7q-, 8p-, 17q-, 18p- - Bon pronòstic: 13q+, sense 1p+, 7p+, +12, 18p+, 18q+, +19, 4p-, 5p-, 6q-, 7p- - Pronòstic intermig: 13q- amb alguna dels anteriors, o altres alteracions
Puiggros <i>et al</i> , 2013	70	Cyto-arrays	SP/Cèl·lules mononucleades de SP/Cèl·lules CD19+	94% Discordances en alteracions en <25-30% per FISH	No	> No s'observa cap associació significativa entre les alteracions identificades per <i>microarrays</i> i el curs clínic dels pacients > Els <i>microarrays</i> no permeten identificar algunes del(17p) i del(11q) detectades en baix percentatge de nuclis per FISH. Són una tècnica complementària a la CC i la FISH però no les haurien de substituir completament

\* HGC: Hibridació genòmica comparada; BACs: Bacterial artificial chromosomes; PACs: P1-derived artificial chromosome; SNPs: *Single nucleotide polymorphism*; SP: sang perifèrica; MO: medulla òssia; N.R.: no realitzat; TPT: temps al primer tractament

### 3. Avantatges i inconvenients de les diferents tècniques d'anàlisi citogenètica en LLC

combinada de diferents tècniques d'anàlisi citogenètica en LLC (CC, FISH i/o *microarrays* genòmics) permeten la identificació d'un ampli ventall d'anomalies no incloses al panell de FISH utilitzat actualment en la rutina diagnòstica. A més, s'ha demostrat que aquestes alteracions i altres característiques dels resultats obtinguts per FISH poden tenir un impacte pronòstic a la malaltia que va més enllà de les categories de risc citogenètic actuals (Döhner *et al*, 2000).

Pel que fa a la **CC**, la seva aplicació s'ha vist fortament limitada per la reduïda taxa mitòtica de la cèl·lula tumoral en cultiu (Juliusson *et al*, 1990). Tot i que diversos autors han demostrat que la utilització de mitògens alternatius al TPA permet incrementar la taxa de detecció d'alteracions (Dicker *et al*, 2006; Haferlach *et al*, 2007; Put *et al*, 2009a; Heerema *et al*, 2010), el FISH ha esdevingut la tècnica d'elecció per a l'estudi citogenètic realitzat a la pràctica clínica de la LLC. Respecte el nivell de detecció d'alteracions, el fet que la taxa de detecció d'anomalies obtinguda per CC al treball 2 (31,4%) fós molt inferior a les altres tècniques confirma la limitació descrita pels cultius basats en TPA a la LLC. No obstant, és destacable que algunes de les alteracions únicament van ser identificades per aquesta metodologia (translocacions equilibrades i guanys/pèrdues en clons minoritaris, per sota el límit de sensibilitat dels Cyto-arrays, i no detectables per les sondes habitualment utilitzades en els panells de FISH). Tot i que cap de les alteracions identificades només per CC al treball 3 té un valor pronòstic definit, cal tenir present que un 32-42% de pacients amb LLC presenten un ampli ventall de translocacions per CC (Mayr *et al*, 2006; Van Den Neste *et al*, 2007; Baliakas *et al*, 2014). En aquest sentit, la CC és la única de les tècniques aplicades en aquesta tesi que permet obtenir, de forma ràpida i econòmica, una visió global del genoma que inclogui reordenaments equilibrats, que poden ser importants pel diagnòstic i/o seguiment clínic dels pacients. Així, la detecció de determinades translocacions podria millorar l'estratificació del pronòstic dels pacients [ex.  $t(14;19)(q32;q24)$  o reordenaments de *MYC*, associats a mal pronòstic (Huh *et al*, 2011; Put *et al*, 2012)], o al diagnòstic diferencial amb altres neoplàsies de cèl·lules B madures [ex. detecció de la  $t(11;14)(q13;q32)$ , que afecta els gens *CCND1/IGH* i és característica del limfoma de cèl·lules del mantell (Vandenberghe *et al*, 1991)]. A més a més, al treball 2, la identificació d'aquells pacients amb  $del(13q)$  per FISH que també presentaven anomalies a 13q14 detectades al cariotip,  $t(13q)$  o  $i-del(13q)$ , va permetre identificar un subgrup de pacients amb  $del(13q)$  que presentava una malaltia més agressiva i un TPT significativament més curt. Els cariotips d'aquests pacients eren molt diversos, i cap de les 25 parelles de translocació identificades al grup  $t(13q)$  va resultar ser recurrent. Aquestes troballes suggerien que la identificació de reordenaments o delecions de 13q14 *per se* no comportava un pitjor pronòstic als pacients amb LLC. En canvi, eren reflex d'un major potencial proliferatiu de les cèl·lules tumorals, que contribuïa a la detec-

ció del clon alterat per CC, i s'associaven a característiques pròpies de la del(13q) o a pèrdues de 17p concomitants [al grup t(13q)] que contribuïen a un pitjor pronòstic dels pacients. Altres autors també han publicat resultats que demostren la utilitat que té la CC en la LLC. S'ha descrit que prop d'un 30% de pacients amb resultat de FISH normal presenten altres alteracions citogenètiques quan són estudiats per CC (Haferlach *et al*, 2007; Rigolin *et al*, 2012). A més, la detecció d'un cariotip complex s'ha associat a una evolució clínica més agressiva (Kujawski *et al*, 2008; Jaglowski *et al*, 2012; Woyach *et al*, 2012).

Una de les principals limitacions de la tècnica de **FISH** és que ofereix una visió del genoma limitada a les sondes analitzades. En aquest sentit, al treball 3 es va demostrar que l'anàlisi complementària de CC i/o Cyto-arrays permetia incrementar la taxa de detecció d'anomalies obtinguda per FISH i oferia una visió global de les alteracions genòmiques dels pacients. Per contra, pel que es refereix a les alteracions amb valor pronòstic establert en LLC (Döhner *et al*, 2000), és destacable que la major taxa de detecció es va assolir mitjançant l'estudi per FISH. A més, el fet que algunes de les del(17p) i del(11q), associades a curs clínic advers i mala resposta als tractaments convencionals, únicament fossin identificades per FISH, demostra la importància clínica de mantenir aquesta tècnica d'anàlisi la pràctica diagnòstica habitual i durant el seguiment dels pacients amb LLC. A més, els resultats obtinguts al treball 1 i 2 suggereixen que l'aplicació del FISH no hauria de restringir-se a determinar la presència o absència de cada anomalia. La informació sobre altres característiques de la pròpia alteració, disponibles sense necessitat d'aplicar estudis addicionals, permeten estratificar el pronòstic dels subgrups contemplats a l'algorisme de Döhner. En concordància amb altres publicacions referents a les del(13q), del(11q) o trisomia 12 (Hernández *et al*, 2009; González-Gascón *et al*, 2015; Jain *et al*, 2015), als treballs 1 i 2 es va descriure un curs clínic més agressiu als pacients amb percentatges elevats de 13q- per FISH. Així mateix, els dos grups de pitjor pronòstic identificats al treball 2 [t(13q i i-del(13q)] presentaven una mediana de nuclis alterats per FISH superior al grup F-del(13q). D'altra banda, malgrat no es va demostrar una associació significativa amb el pronòstic, els resultats dels dos treballs d'aquesta tesi referents a 13q també suggereixen que el número d'al·lels de 13q delecionats és una informació que pot ser d'utilitat en el maneig de la LLC. En referència al treball 1, tant la detecció d'una mediana de nuclis alterats superior observada als grups amb deleció de 13q bial·lèlica, aïllada (13qx2) o en mosaic (13qM), respecte als pacients amb pèrdua monoal·lèlica (13qx1) com l'evolució clonal demostrada en algunes pèrdues bial·lèliques suggereixen que aquestes tenen un major potencial de malignitat que les delecions monoal·lèliques. D'altra banda, al treball 2 es va demostrar una major incidència de pèrdues bial·lèliques als pacients amb t(13q), un dels grups del treball associats a pitjor pronòstic.



Respecte als **microarrays genòmics**, al treball 3 es va demostrar la capacitat dels Cyto-arrays per a la detecció d'anomalies cromosòmiques en LLC i, a més, es va obtenir una taxa de concordança amb els resultats de FISH comparables a les publicades per altres plataformes de *microarrays* (Tyybakinoja *et al*, 2007; Gunn *et al*, 2008; Ouillette *et al*, 2008; Gunnarson *et al*, 2010; O'Malley *et al*, 2011). No obstant, els resultats obtinguts suggereixen que aquesta metodologia no és òptima per a la seva incorporació a la rutina diagnòstica. Per una banda, tot i ser la tècnica que va oferir la major taxa de detecció d'alteracions, la significància clínica que tenen la majoria d'anomalies identificades per Cyto-arrays no ha estat ben definida. D'altra banda, es van identificar algunes limitacions respecte les tècniques convencionals, com la sensibilitat baixa en la detecció d'alteracions recurrents associades a mal pronòstic o la incapacitat de detectar alteracions equilibrades que podrien ser importants pel diagnòstic diferencial amb altres neoplàsies de cèl·lules B o en l'estratificació pronòstica dels pacients amb LLC (ex. translocacions associades a curs clínic agressiu o pacients amb del(13q) associada a translocació).

Globalment, els resultats obtinguts suggereixen que la CC i el FISH haurien de mantenir-se com a tècniques d'elecció per a la caracterització citogenètica dels pacients amb LLC, i que l'anàlisi per *microarrays* genòmics hauria de ser considerat com a tècnica complementària. D'altra banda, cal tenir present que la implementació de les tècniques de *next generation sequencing* (NGS) ha permès descriure la importància clínica que tenen les mutacions en gens com *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1* o *BIRC3*, entre d'altres, i que ja s'ha proposat una nova definició del model pronòstic citogenètic que combina les alteracions genètiques tradicionals amb les noves mutacions (Rossi *et al*, 2013). Així doncs, és d'esperar que en un futur proper les recomanacions per al diagnòstic i seguiment dels pacients amb LLC integrin les alteracions citogenètiques estudiades actualment amb la caracterització de les noves mutacions mitjançant NGS.





# Conclusions

# Conclusions

## 1. Pel que es refereix a l'estudi de la variabilitat dels pacients amb LLC i deleció de 13q:

1.1. Els pacients amb LLC i del(13q) aïllada detectada per FISH formen un grup heterogeni en el qual:

1.1.1. El percentatge de cèl·lules alterades detectades per FISH té un impacte significatiu tant en la incidència acumulada de tractament als cinc anys com en la supervivència global. El punt de tall amb major poder predictiu és del 90%, també presenta un efecte significatiu en el pronòstic de la LLC quan és tractat com a variable contínua.

1.1.2. Les pèrdues bial·lèliques de 13q es detecten en una mediana de nuclis per FISH superior a les monoal·lèliques i sorgeixen com a evolució clonal d'aquestes. No obstant, malgrat que aquestes característiques suggereixen un major potencial de malignitat, l'efecte que comporta la pèrdua del segon al·lel de 13q no és suficient per generar diferències significatives en les característiques al diagnòstic o en l'evolució clínica dels pacients amb LLC i del(13q) aïllada per FISH.

1.2. Pel que es refereix a les alteracions cariotípiques que afecten la regió 13q14:

1.2.1. Les translocacions de 13q no presenten parelles de reordenament recurrents i s'associen a pèrdua del *locus* D13S319, localitzat a 13q14. Els resultats obtinguts suggereixen que la conseqüència de la translocació és la pèrdua d'un o més gens a 13q14, en lloc de la generació d'un proto-oncogen com a conseqüència del reordenament.

1.2.2. Els pacients amb translocacions de 13q14 [t(13q)] o delecions intersticials de 13q detectades al cariotip [i-del(13q)] s'associen a característiques citogenètiques que contribueixen a un curs clínic més agressiu. La mediana de nuclis alterats en ambdós grups és superior a la dels pacients amb del(13q) identificades únicament per FISH. A més, els pacients amb t(13q) s'associen a una major incidència de pèrdues bial·lèliques i delecions de 17p concomitants, i les i-del(13q) inclouen el gen *RB1* en una taxa superior a la descrita pels pacients amb t(13q) o del(13q) no detectable al cariotip.

1.2.3. L'anàlisi per citogenètica convencional (CC) als pacients amb del(13q) permet identificar un subgrup de pacients amb del(13q) que presenta un curs clínic més agressiu. Els pacients amb alteracions de 13q14 al cariotip, t(13q) o i-del(13q),

s'associen a un temps fins al primer tractament inferior a aquells amb del(13q) identificades únicament per FISH.

## 2. Pel que respecta a l'aplicabilitat dels *microarrays* genòmics com a tècnica d'anàlisi citogenètica rutinària en la LLC:

2.1. L'anàlisi per *microarrays* és una tècnica vàlida per a la detecció d'alteracions cromosòmiques, conegudes o noves, en LLC. La taxa de detecció d'anomalies assolida per *microarrays* és superior a la de les tècniques convencionals utilitzades actualment (CC i FISH).

2.2. La tècnica de *microarrays* ofereix una sensibilitat inferior que l'anàlisi per FISH, i pot suposar la manca de detecció d'algunes alteracions amb valor pronòstic conegut que són detectades actualment per FISH. La completa substitució de les tècniques convencionals pels *microarrays* podria repercutir negativament al maneig clínic dels pacients portadors de clons minoritaris amb alteracions de mal pronòstic, com les pèrdues a 11q o 17p.

2.3. La CC i el FISH han de seguir essent les tècniques d'elecció per a la caracterització citogenètica dels pacients amb LLC a la pràctica clínica. No obstant, l'aplicació dels *microarrays* com a tècnica complementària pot ser d'utilitat en alguns casos.



## Bibliografia



## Bibliografia

Asslaber D, Piñón JD, Seyfried I, et al. microRNA-34a expression correlates with MDM2 SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(21):4191–7.

Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Tsompanakou A, et al. Clinical, immunophenotypic, and molecular profiling of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia and comparison with other karyotypic subgroups defined by cytogenetic analysis. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2006;168(2):109–19.

Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*. 2012;119(2):329–31.

Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am. J. Hematol.* 2014;89(3):249–55.

Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198–206.

Birren BW, Tachi-iri Y, Kim UJ, et al. A human chromosome 22 fosmid resource: mapping and analysis of 96 clones. *Genomics*. 1996;34(1):97–106.

Brown JR, Hanna M, Tesar B, et al. Integrative genomic analysis implicates gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2012;18(14):3791–802.

Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2014;32(9):897–904.

Burger JA. Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors in clinical trials. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2014;9(1):44–9.

Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(3):213–23.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99(24):15524–9.

Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370(9583):230–9.

Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A, et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br. J. Haematol*. 2008;142(4):529–37.

Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, et al. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk. Res*. 2010;34(1):63–8.

Chena C, Avalos JS, Bezares RF, et al. Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. *Eur. J. Haematol*. 2008;81(2):94–9.

Cheng S, Ma J, Guo A, et al. BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia*. 2014;28(3):649–57.

Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996;87(12):4990–7.

Cheson BD, Bennett JM, Rai KR, et al. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the National Cancer Institute-sponsored working group. *Am. J. Hematol*. 1988;29(3):152–63.

Collado R, Hueso J, Cabello AI, et al. New translocations in a case of atypical B-cell chronic lymphocytic leukemia: involvement of ATM, MLL, and TP53 genes. *Cancer Genet. Cytogenet*. 2006;169(2):176–8.

Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2011;8(1):38–47.

Criel A, Michaux L, De Wolf-Peeters C. The concept of typical and atypical chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk. Lymphoma*. 1999;33(1-2):33–45.

Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, et al. Chronic lymphocytic leukemia with 6q shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*. 2004;18(3):476–83.

Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes. Chromosomes Cancer*. 2011;50(8):633–43.

Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840–7.

Davids MS, Letai A, Brown JR. Overcoming stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia through BCL-2 inhibition. *Leuk. Lymphoma*. 2013;54(8):1823–5.

Delgado J, Aventin A, Briones J, et al. The use of tetradecanoylphorbol acetate-stimulated peripheral blood cells enhances the prognostic value of interphase fluorescence in situ hybridization in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Genes. Chromosomes Cancer*. 2010;49(4):327–32.

Delgado J, Espinet B, Oliveira AC, et al. Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *Br. J. Haematol*. 2012;157(1):67–74.

DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA. Cancer J. Clin*. 64(4):252–71.

Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol*. 2003;121(2):287–95.

Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*. 2006;108(9):3152–60.

Dighiero G, Maloum K, Desablens B, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med*. 1998;338(21):1506–14.

Döhner H, Fischer K, Bentz M, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;85(6):1580–9.

Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2000;343(26):1910–6.

Edelmann J, Holzmann K, Miller F, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood.* 2012;120(24):4783–94.

Eichhorst BF, Busch R, Stilgenbauer S, et al. First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2009;114(16):3382–91.

Espinet B, Bellosillo B, Melero C, et al. FISH is better than BIOMED-2 PCR to detect IgH/BCL2 translocation in follicular lymphoma at diagnosis using paraffin-embedded tissue sections. *Leuk. Res.* 2008;32(5):737–42.

Fabris S, Mosca L, Todoerti K, et al. Molecular and transcriptional characterization of 17p loss in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes. Chromosomes Cancer.* 2008;47(9):781–93.

Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin. Invest.* 1998;102(8):1515–25.

Falisi E, Novella E, Visco C, et al. B-cell receptor configuration and mutational analysis of patients with chronic lymphocytic leukaemia and trisomy 12 reveal recurrent molecular abnormalities. *Hematol. Oncol.* 2014;32(1):22-30.

Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, et al. Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion. *Br. J. Haematol.* 2008;143(4):532–6.

Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2014;370(11):997–1007.

Gardiner AC, Corcoran MM, Oscier DG. Cytogenetic, fluorescence in situ hybridisation, and clinical evaluation of translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukaemia. *Genes. Chromosomes Cancer.* 1997;20(1):73–81.

Garg R, Wierda W, Ferrajoli A, et al. The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2012;118(14):3531–7.

Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111(2):865–73.

Gentile M, Cutrona G, Neri A, et al. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica*. 2009;94(6):887–8.

Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007;21(1):1–3.

González D, Martínez P, Wade R, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J. Clin. Oncol*. 2011;29(16):2223–9.

González-Gascón Y, Marín I, Hernández-Sánchez M, Rodríguez-Vicente A-E, et al. A high proportion of cells carrying trisomy 12 is associated with a worse outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol*. 2015.

Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J. Clin. Oncol*. 2007;25(7):799–804.

Gunn SR, Mohammed MS, Gorre ME, et al. Whole-genome scanning by array comparative genomic hybridization as a clinical tool for risk assessment in chronic lymphocytic leukemia. *J. Mol. Diagn*. 2008;10(5):442–51.

Gunn SR, Bolla AR, Barron LL, et al. Array CGH analysis of chronic lymphocytic leukemia reveals frequent cryptic monoallelic and biallelic deletions of chromosome 22q11 that include the PRAME gene. *Leuk. Res*. 2009;33(9):1276–81.

Gunn SR, Hibbard MK, Ismail SH, et al. Atypical 11q deletions identified by array CGH may be missed by FISH panels for prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2009;23(5):1011–7.

Gunnarsson R, Staaf J, Jansson M, et al. Screening for copy-number alterations and loss of heterozygosity in chronic lymphocytic leukemia—a comparative study of four differently designed, high resolution microarray platforms. *Genes. Chromosomes Cancer*. 2008;47(8):697–711.

Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, et al. Large but not small copy-number alterations correlate to high-risk genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia: a high-resolution genomic screening of newly diagnosed patients. *Leukemia*. 2010;24(1):211–5.

Gunnarsson R, Mansouri L, Isaksson A, et al. Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2011;96(8):1161–9.

Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*. 2007;21(12):2442–51.

Hagenkord JM, Monzon FA, Kash SF, et al. Array-based karyotyping for prognostic assessment in chronic lymphocytic leukemia: performance comparison of Affymetrix 10K2.0, 250K Nsp, and SNP6.0 arrays. *J. Mol. Diagn.* 2010;12(2):184–96.

Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446–56.

Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1164–74.

Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Blood*. 2013;122(23):3723–34.

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.

Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002;99(3):1023–9.

Harper ME, Saunders GF. Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma*. 1981;83(3):431–9.

Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S, et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J. Clin. Oncol.* 2004;22(19):3937–49.

Heerema NA, Byrd JC, Dal Cin PS, et al. Stimulation of chronic lymphocytic leukemia cells with CpG oligodeoxynucleotide gives consistent karyotypic results among laboratories: a CLL Research Consortium (CRC) Study. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2010;203(2):134–40.

Hernández JA, Rodríguez AE, González M, et al. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica.* 2009;94(3):364–71.

Higgins RA, Gunn SR, Robetorye RS. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization for the identification of prognostically important genetic alterations in chronic lymphocytic leukemia. *Mol. Diagn. Ther.* 2008;12(5):271–80.

Houldsworth J, Guttapalli A, Thodima V, et al. Genomic imbalance defines three prognostic groups for risk stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma.* 2014;55(4):920–8.

Hruba M, Dvorak P, Weberova L, Subrt I. Independent coexistence of clones with 13q14 deletion at reciprocal translocation breakpoint and 13q14 interstitial deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma.* 2012;53(10):2054–62.

Huh YO, Lin KI-C, Vega F, et al. MYC translocation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with increased prolymphocytes and a poor prognosis. *Br. J. Haematol.* 2008;142(1):36–44.

Huh YO, Schweighofer CD, Ketterling RP, et al. Chronic lymphocytic leukemia with t(14;19)(q32;q13) is characterized by atypical morphologic and immunophenotypic features and distinctive genetic features. *Am. J. Clin. Pathol.* 2011;135(5):686–96.

Ibbotson R, Athanasiadou A, Sutton LA, et al. Coexistence of trisomies of chromosomes 12 and 19 in chronic lymphocytic leukemia occurs exclusively in the rare IgG-positive variant. *Leukemia.* 2012;26(1):170–2.

Jaglowski SM, Ruppert AS, Heerema NA, et al. Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2012;159(1):82–7.

Jain N, O'Brien S. Chronic lymphocytic leukemia with deletion 17p: emerging treatment options. *Oncology (Williston Park)*. 2012;26(11):1067, 1070.

Jain P, Keating M, Thompson P, et al. High FISH percentage of deletion 11q in patients with chronic lymphocytic leukemia is an independent predictor of adverse outcome. *Am. J. Hematol*. 2015.

Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*. 2014;28(1):108–17.

Johnson AJ, Yeh Y-Y, Smith LL, et al. The novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH727965) promotes apoptosis and abrogates microenvironmental cytokine protection in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2012;26(12):2554–7.

Jones KW. Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. *Nature*. 1970;225(5236):912–5.

Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N. Engl. J. Med*. 1990;323(11):720–4.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258(5083):818–21.

Kay NE, Eckel-Passow JE, Braggio E, et al. Progressive but previously untreated CLL patients with greater array CGH complexity exhibit a less durable response to chemoimmunotherapy. *Cancer Genet. Cytogenet*. 2010;203(2):161–8.

Kienle DL, Korz C, Hosch B, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J. Clin. Oncol*. 2005;23(16):3780–92.

Klein U, Lia M, Crespo M, 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.

Kolquist KA, Schultz RA, Slovak ML, et al. Evaluation of chronic lymphocytic leukemia by oligonucleotide-based microarray analysis uncovers novel aberrations not detected by FISH or cytogenetic analysis. *Mol. Cytogenet*. 2011;4:25.



Koníková E, Kusenda J. Altered expression of p53 and MDM2 proteins in hematological malignancies. *Neoplasma*. 2003;50(1):31–40.

Konoplev SN, Fritsche HA, O'Brien S, et al. High serum thymidine kinase 1 level predicts poorer survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 2010;134(3):472–7.

Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S, et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2006;24(6):969–75.

Kujawski L, Ouillette P, Erba H, et al. Genomic complexity identifies patients with aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(5):1993–2003.

Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013;152(4):714–26.

Nelson DL y Cox MM. *Lehninger Principios de Bioquímica*. (4ª edición). Ed. Omega. 2006.

Letestu R, Lévy V, Eclache V, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood*. 2010;116(22):4588–90.

Liehr T, Weise A, Heller A, et al. Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet. Genome Res.* 2002;97(1-2):43–50.

López C, Delgado J, Costa D, et al. Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. *Genes. Chromosomes Cancer*. 2012;51(9):881–9.

López C, Baumann T, Costa D, et al. A new genetic abnormality leading to TP53 gene deletion in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2012;156(5):612–8.

Maciejewski JP, Tiu R V, O'Keefe C. Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* 2009;146(5):479–88.

Makishima H, Maciejewski JP. Pathogenesis and consequences of uniparental disomy in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2011;17(12):3913–23.

Malek SN. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene.* 2013;32(23):2805–17.

Marasca R, Maffei R, Martinelli S, et al. Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematol. Oncol.* 2013;31(2):348–55.

Mark HFL, Wyandt H, Huang XL, Milunsky JM. Delineation of a supernumerary marker chromosome utilizing a multimodal approach of G-banding, fluorescent in situ hybridization, confirmatory P1 artificial chromosome fluorescent in situ hybridization, and high-resolution comparative genomic hybridization. *Clin. Genet.* 2005;68(2):146–51.

Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br. J. Haematol.* 1996;92(2):382–8.

Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006;107(2):742–51.

McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* 2000;2000:1-14.

Meffre E, Casellas R, Nussenzweig MC. Antibody regulation of B cell development. *Nat. Immunol.* 2000;1(5):379–85.

Mei R, Galipeau PC, Prass C, et al. Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays. *Genome Res.* 2000;10(8):1126–37.

Mertens D, Wolf S, Tschuch C, et al. Allelic silencing at the tumor-suppressor locus 13q14.3 suggests an epigenetic tumor-suppressor mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(20):7741–6.

Mian M, Rinaldi A, Mensah AA, et al. Del(13q14.3) length matters: an integrated analysis of genomic, fluorescence in situ hybridization and clinical data in 169 chro-

nic lymphocytic leukaemia patients with 13q deletion alone or a normal karyotype. *Hematol. Oncol.* 2012;30(1):46–9.

Mian M, Rinaldi A, Mensah AA, et al. Large genomic aberrations detected by SNP array are independent prognosticators of a shorter time to first treatment in chronic lymphocytic leukemia patients with normal FISH. *Ann. Oncol.* 2013;24(5):1378–84.

Mosca L, Fabris S, Lionetti M, et al. Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clin. Cancer Res.* 2010;16(23):5641–53.

O'Malley DP, Giudice C, Chang AS, et al. Comparison of array comparative genomic hybridization (aCGH) to FISH and cytogenetics in prognostic evaluation of chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Lab. Hematol.* 2011;33(3):238–44.

Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2004;363(9403):105–11.

Orlandi EM, Bernasconi P, Pascutto C, et al. Chronic lymphocytic leukemia with del13q14 as the sole abnormality: dynamic prognostic estimate by interphase-FISH. *Hematol. Oncol.* 2013;31(3):136–42.

Oscier DG, Stevens J, Hamblin TJ, et al. Correlation of chromosome abnormalities with laboratory features and clinical course in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1990;76(3):352–8.

Oscier DG, Thompsett A, Zhu D, Stevenson FK. Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood.* 1997;89(11):4153–60.

Oscier D, Wade R, Davis Z, et al. Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation. *Haematologica.* 2010;95(10):1705–12.

Ouillette P, Erba H, Kujawski L, et al. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res.* 2008;68(4):1012–21.

Ouillette P, Fossum S, Parkin B, et al. Aggressive chronic lymphocytic leukemia with elevated genomic complexity is associated with multiple gene defects in the response to DNA double-strand breaks. *Clin. Cancer Res.* 2010;16(3):835–47.

Ouillet P, Collins R, Shakhan S, et al. The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2011;17(21):6778–90.

Ouillet P, Collins R, Shakhan S, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;118(11):3051–61.

Ouillet P, Li J, Shaknovich R, et al. Incidence and clinical implications of ATM aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Genes. Chromosomes Cancer.* 2012;51(12):1125–32.

Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1969;64(2):600–4.

Parker H, Rose-Zerilli MJ, Parker A, et al. 13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2011;25(3):489–97.

Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, et al. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 2008;26:481–511.

Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat. Genet.* 1998;20(2):207–11.

Porpaczy E, Bilban M, Heinze G, et al. Gene expression signature of chronic lymphocytic leukaemia with Trisomy 12. *Eur. J. Clin. Invest.* 2009;39(7):568–75.

Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2011;475(7354):101–5.

Put N, Konings P, Rack K, et al. Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin-2 stimulation: A Belgian multicentric study. *Genes. Chromosomes Cancer.* 2009;48(10):843–53.

Put N, Meeus P, Chatelain B, et al. Translocation t(14;18) is not associated with inferior outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2009;23(6):1201–4.

Put N, Van Roosbroeck K, Konings P, et al. Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course. *Ann. Hematol.* 2012;91(6):863–73.

Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 2012;44(1):47–52.

Quijano S, López A, Rasillo A, et al. Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2008;74(3):139–49.

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975;46(2):219–34.

Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2000;343(24):1750–7.

Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004;351(9):893–901.

Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2008;112(5):1923–30.

Reddy KS. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br. J. Haematol.* 2006;132(6):705–22.

Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 1977;113(1):237–51.

Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with “normal” FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood.* 2012;119(10):2310–3.

Rinaldi A, Mian M, Kwee I, et al. Genome-wide DNA profiling better defines the prognosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2011;154(5):590–9.

Rodríguez AE, Hernández JÁ, Benito R, et al. Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia patients with a high number of losses in 13q14. *PLoS One.*

2012;7(11):e48485.

Rodríguez AE, Robledo C, García JL, et al. Identification of a novel recurrent gain on 20q13 in chronic lymphocytic leukemia by array CGH and gene expression profiling. *Ann. Oncol.* 2012;23(8):2138–46.

Roos-Weil, Nguyen-Khac F, Chevret S, Roux C, et al. Mutational and Cytogenetic Analyses Of 177 CLL Patients With Trisomy 12: A Retrospective Study Of The CLL French Intergroup. *Blood.* 2013;122(21):4144.

Rose-Zerilli MJJ, Forster J, Parker H, et al. ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica.* 2014;99(4):736–42.

Rossi D, Fangazio M, Rasi S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119(12):2854–62.

Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2013;121(8):1403–12.

Rossi D, Khiabani H, Spina V, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014;123(14):2139–47.

Rudenko HC, Else M, Dearden C, et al. Characterising the TP53-deleted subgroup of chronic lymphocytic leukemia: an analysis of additional cytogenetic abnormalities detected by interphase fluorescence in situ hybridisation and array-based comparative genomic hybridisation. *Leuk. Lymphoma.* 2008;49(10):1879–86.

Saka B, Aktan M, Sami U, et al. Prognostic importance of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Lab. Haematol.* 2006;28(1):30–5.

Sampath D, Liu C, Vasan K, et al. Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119(5):1162–72.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 1975;94(3):441–8.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibi-

tors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977;74(12):5463–7.

Sargent R, Jones D, Abruzzo L V, et al. Customized oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization as a clinical assay for genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia. *J. Mol. Diagn.* 2009;11(1):25–34.

Schultz RA, Delioukina M, Gaal K, et al. Evaluation of chronic lymphocytic leukemia by BAC-based microarray analysis. *Mol. Cytogenet.* 2011;4(1):4.

Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(4):1039–44.

Scrucca L, Santucci A, Aversa F. Competing risk analysis using R: an easy guide for clinicians. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40(4):381–7.

Scrucca L, Santucci A, Aversa F. Regression modeling of competing risk using R: an in depth guide for clinicians. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(9):1388–95.

Sellmann L, Gesk S, Walter C, et al. Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2007;138(2):217–20.

Shaffer L, Slovak M, Campbell L. 2009. *ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* Karger Medical and Scientific Publishers.

Shaffer L, McGowan-Jordan J, Schmid M. 2013. *ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* Karger Medical and Scientific Publishers.

Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, et al. Brief report: natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2009;27(24):3959–63.

Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, et al. Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;95(3):738–43.

Smolewski P, Witkowska M, Korycka-Wołowicz A. New insights into biology, prognostic factors, and current therapeutic strategies in chronic lymphocytic leukemia.

ISRN Oncol. 2013;2013:740615.

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes. Chromosomes Cancer*. 1997;20(4):399–407.

Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat. Rev. Genet*. 2005;6(10):782–92.

Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*. 2011;144(1):27–40.

Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, et al. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 1999;13(9):1331–4.

Stilgenbauer S, Zenz T, Winkler D, et al. Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J. Clin. Oncol*. 2009;27(24):3994–4001.

Struski S, Helias C, Gervais C, et al. 13q deletions in B-cell lymphoproliferative disorders: frequent association with translocation. *Cancer Genet. Cytogenet*. 2007;174(2):151–60.

Sutton LA, Rosenquist R. Deciphering the molecular landscape in chronic lymphocytic leukemia: time frame of disease evolution. *Haematologica*. 2015;100(1):7–16.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.

Tam CS, O'Brien S, Wierda W, et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(4):975–80.

Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood*. 2009;114(5):957–64.

Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(6):2262–4.



Travella A, Ripollés L, Aventin A, et al. Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia. Cytogenetic and FISH analysis. *Hematol. Oncol.* 2013;31(2):79–87.

Tsimberidou A-M, Tam C, Abruzzo L V, et al. Chemoimmunotherapy may overcome the adverse prognostic significance of 11q deletion in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2009;115(2):373–80.

Tsuchiya D, Matsumoto A, Covert SF, Bronson CR, Taga M. Physical mapping of plasmid and cosmid clones in filamentous fungi by fiber-FISH. *Fungal Genet. Biol.* 2002;37(1):22–8.

Tyybakinoja A, Vilpo J, Knuutila S. High-resolution oligonucleotide array-CGH pinpoints genes involved in cryptic losses in chronic lymphocytic leukemia. *Cytogenet. Genome Res.* 2007;118(1):8–12.

Vandenbergh E, De Wolf-Peeters C, van den Oord J, et al. Translocation (11;14): a cytogenetic anomaly associated with B-cell lymphomas of non-follicle centre cell lineage. *J. Pathol.* 1991;163(1):13–8.

Van Den Neste E, Robin V, Francart J, et al. Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia.* 2007;21(8):1715–22.

Van Dyke DL, Shanafelt TD, Call TG, et al. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2010;148(4):544–50.

Von Deimling F, Scharf JM, Liehr T, et al. Human and mouse RAD17 genes: identification, localization, genomic structure and histological expression pattern in normal testis and seminoma. *Hum. Genet.* 1999;105(1-2):17–27.

Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia.* 2013;27(5):1100–6.

Wawrzyniak E, Kotkowska A, Blonski JZ, et al. Clonal evolution in CLL patients as detected by FISH versus chromosome banding analysis, and its clinical significance. *Eur. J. Haematol.* 2014;92(2):91–101.

Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Multivariable model for time to first treatment

in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2011;29(31):4088–95.

Winkler D, Schneider C, Kröber A, et al. Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia.* 2005;19(7):1211–5.

Woessner S, Solé F, Pérez-Losada A, Florensa L, Vilá RM. Trisomy 12 is a rare cytogenetic finding in typical chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.* 1996;20(5):369–74.

Woyach JA, Heerema NA, Zhao J, et al. Dic(17;18)(p11.2;p11.2) is a recurring abnormality in chronic lymphocytic leukaemia associated with aggressive disease. *Br. J. Haematol.* 2010;148(5):754–9.

Woyach JA, Lozanski G, Ruppert AS, et al. Outcome of patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia treated with flavopiridol: impact of genetic features. *Leukemia.* 2012;26(6):1442–4.

Zenz T, Kröber A, Scherer K, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood.* 2008;112(8):3322–9.

Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer.* 2010;10(1):37–50.

Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia.* 2010;24(12):2072–9.



