



FACULTADE DE MEDICINA
E ODONTOLOXÍA

Traballo de fin de grado

Identificación del perfil mutacional asociado a la hipermutación somática de las cadenas ligeras Kappa en la LLC

Identificación do perfil mutacional asociado á hipermutación somática das cadeas lixeiras Kappa na LLC

Identification of the mutational profile associated with somatic hypermutation of Kappa light chains in CLL

Autor/a/es/as: Pablo Pazos Lama

Tutor/a: José Luis Bello López

Cotutor/a: Adrián Mosquera Orgueira

Departamento: Departamento de Psiquiatría, Radiología, Salud Pública, Enfermería y Medicina

Julio 2021

Traballo de Fin de Grado presentado en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela para la obtención del Grado en Medicina

- Resumen**
- Glosario**
- 1. Introducción**
 - 1.1 Definición**
 - 1.2 Factores implicados**
 - 1.2.1 Factores ambientales**
 - 1.2.2 Factores hereditarios**
 - 1.3 Biología de la LLC e implicaciones clínicas**
 - 1.4 Diagnóstico**
 - 1.5 Manifestaciones clínicas**
 - 1.6 Factores pronósticos**
 - 1.7 Estadiaje clínico**
 - 1.8 Tratamiento**
- 2. Objetivos**
- 3. Metodología**
- 4. Análisis**
 - 4.1 Análisis descriptivo**
 - 4.2 Análisis comparativo**
- 5. Discusión**
- 6. Conclusiones**
- Referencias bibliográficas**

Resumen

La Leucemia Linfática Crónica es una enfermedad con una heterogeneidad clínica importante. La mayor parte de los pacientes son asintomáticos al diagnóstico, y el tratamiento se reserva para aquellos casos de progresión de la enfermedad, cuando aparecen síntomas. La terapia en estos estadios puede no lograr la remisión completa dadas las características de la neoplasia.

Diferentes estudios han avanzado en la búsqueda de marcadores pronósticos asociados a la evolución del trastorno, todo con el objetivo de definir aquellos pacientes que van a necesitar un tratamiento precoz, y de esta forma aumentar la supervivencia global de los mismos. Ante la gran cantidad de factores pronósticos establecidos en los últimos años, resulta lógico pensar que todavía nos encontramos lejos de una caracterización eficaz de estos grupos.

En el presente estudio intentamos caracterizar mejor los grupos pronósticos de un estudio previo, encontrando diferencias significativas en los genes entre los diferentes grupos pronósticos propuestos, en especial NOTCH1. Este último nos ha permitido definir mejor los grupos intermedios, siendo necesarios análisis en investigaciones futuras para aclarar si esta diferencia tiene utilidad clínica.

Palabras clave: LLC, LLP, IGKC, IGHV, grupos pronósticos.

Resumo

A Leucemia Linfática Crónica é unha enfermidade cunha heteroxeneidade clínica importante. A meirande parte dos pacientes son asintomáticos ao diagnóstico, e o tratamento resérvase para aqueles casos de progresión da enfermidade, cando aparece sintomatoloxía. A terapia nestes estadios pode non acadar a remisión completa tendo en conta as características da neoplasia.

Diferentes estudos avanzaron na búsqueda de marcadores pronósticos asociados á evolución do trastorno, todo co obxectivo de definir aqueles pacientes que van a necesitar un tratamento precoz, e de esta forma aumentar a supervivencia global dos mesmos. Ante a grande cantidade de factores pronósticos establecidos nos últimos anos, resulta lóxico pensar que aínda nos atopamos lonxe dunha caracterización eficaz destes grupos.

No presente estudo intentamos caracterizar mellor os grupos pronósticos dun estudo previo, atopando diferenzas significativas nos xenes entre os diferentes grupos pronósticos propostos, en especial NOTCH1. Este último permitiunos definir mellor os grupos intermedios, sendo necesarios análisis en investigacións futuras para clarexar se esta diferenza ten utilidade clínica.

Palabras clave: LLC, LLP, IGKC, IGHV, grupos pronósticos.

Abstract

Chronic Lymphocytic Leukemia is a disease with quite an important clinical heterogeneity. The majority of patients are asymptomatic upon diagnosis, and treatment is reserved to those cases with disease progression, just when symptoms appear. Therapy in these stages may not accomplish complete remission, taking tumor characteristics into account.

Different studies have shed some light on the search of prognostic markers associated to the evolution of the disorder, with the aim to define those patients who will need an early therapy, and to increase their overall survival. Having all these prognostic factors in mind, it is expected to assume that we are far from a definitive classification of these groups.

In this study we tried to characterize better the prognostic groups from a previous study. We found significative differences between the prognostic groups proposed, using distinct genes to compare this differences. NOTCH1 stands out the most, allowing us to define the intermediate groups better, and needing more studies in the near future to clarify wether these differences have clinical utility.

Keywords: CLL, SLL, IGKC, IGHV, prognostic groups.

Glosario

3'UTR (3' untranslated regions): zonas de ARNm situadas en el extremo 3' que no codifican aminoácidos, pero que tienen un papel fundamental en el proceso de traducción y en proporcionar estabilidad al ARNm (1). Existen también estas regiones en el extremo 5' (**5'UTR**).

ATM: la proteína codificada por este gen forma parte de la familia de las PI3/PI4 kinasas. Con capacidad para fosforilar otras proteínas, funciona como un regulador de una gran variedad de proteínas que forman parte de cascadas de señalización, como son p53 y BRCA1, proteínas supresoras de tumores.

BCR (*B-cell Receptor*): Receptor de linfocito B. Complejo multimérico que contribuye a la activación y desarrollo del linfocito B.

BIRC3: proteína que tiene función inhibidora de la apoptosis uniéndose a los receptores de factores asociados al TNF (TRAF1 y TRAF2).

BTK (*Bruton Tyrosine Kinase*): tirosin kinasa de Bruton, implicada en el proceso de desarrollo del linfocito B.

CCL3 (*C-C motif Chemokine Ligand 3*): este locus codifica a una citoquina, también conocida como **MIP1 α (*Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha*)**, que participa en respuestas inflamatorias uniéndose a receptores de quimioquinas CCR1, CCR4 y CCR5.

CD5: glucoproteína transmembrana de tipo I localizada en la superficie de timocitos, linfocitos T y determinados linfocitos B.

CD19: proteína de superficie expresada característicamente por los linfocitos B. Constituye un marcador de desarrollo presente en linfocitos pre-B, y su expresión disminuye con la diferenciación posterior del linfocito B a célula plasmática. Esta molécula forma un complejo junto con otros antígenos de superficie que asociados al BCR permiten disminuir el umbral de activación de este actuando como correceptores.

CD20: molécula de superficie del linfocito B que juega un papel importante en el proceso de diferenciación del linfocito B a célula plasmática.

CD23: también llamado **FCER2 (*Fc Fragment of IgE receptor II*)**, es un antígeno específico del linfocito B a la vez que un receptor de baja afinidad para IgE. Participa en el proceso de diferenciación del linfocito B, además de en la regulación de la producción de IgE.

CD79b: proteína que forma parte del complejo multimérico del receptor del linfocito B, que se une de forma no covalente a la inmunoglobulina de superficie, y que junto con CD79a, contribuye a la expresión y funcionamiento del BCR.

Del(11q): deleción en el brazo largo del cromosoma 11. Genes como ATM y BIRC3 se encuentran ahí.

Del (17p): deleción en el brazo corto del cromosoma 17. En dicho brazo se encuentra el locus de TP53, gen que codifica a p53, proteína supresora de tumores que contiene implicada en la apoptosis, la reparación del ADN o los cambios en el metabolismo celular.

IGH (*Immunoglobulin Heavy locus*): Locus de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Dicho locus incluye los segmentos V (*variable*), D (*diversity*), J (*joining*) y C (*constant*).

IGHV (*Immunoglobulin Heavy Variable Cluster*): Región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina.

IGKC (*Immunoglobulin Kappa Constant Region*): región constante de la cadena ligera Kappa. Junto con la región variable, conforman la cadena ligera de la inmunoglobulina. Presenta funciones de señalización.

IGKJ (*Immunoglobulin Kappa Joining Cluster*): la cadena ligera está constituida por una región variable N-terminal, conteniendo el sitio de unión al antígeno, y una región constante C-terminal. La región variable de la cadena ligera kappa está conformada por dos tipos de genes: genes V (*variable*) y genes J (*joining*). El locus de la cadena ligera kappa está en el cromosoma 2, y contiene en torno a 40 genes funcionales V, seguidos de aproximadamente 5 genes funcionales J; debido a los polimorfismos, el número de estos genes puede diferir entre individuos (2).

IKZF3 (*IKAROS family Zinc Finger 3*): este gen codifica a un miembro de la familia de proteínas de Ikaros. Tres miembros de esta familia proteica (Ikaros, Aiolos y Helios) son factores de transcripción hematopoyéticos implicados en la regulación del desarrollo linfocitario. Este gen en concreto es un factor de transcripción que participa en la regulación de la proliferación y diferenciación de linfocitos B.

LLC: Leucemia Linfocítica Crónica

MAP3K4 (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 4*): este gen codifica una MAPKKK, la proteína MEKK4, también llamada MTK1, que participa en vías que se activan por estrés asociado a factores inflamatorios, radiación UV o cambios osmóticos bruscos, entre otros.

MBL (*Monoclonal B-Lymphocytosis*): condición hematológica asintomática caracterizada por la presencia de clones de linfocitos B con un fenotipo de superficie similar a la Leucemia Linfocítica Crónica, siendo una entidad precursora de esta última (3).

NOTCH1: gen que codifica un receptor transmembrana que juega un papel importante en el desarrollo de numerosos tejidos. La vía de señalización de NOTCH participa en procesos de especificación, diferenciación, proliferación y supervivencia celular.

PAX5 (*Paired Box 5*): forma parte de una familia de factores de transcripción cuya principal característica es la presencia de una región altamente conservada de unión al ADN, conocida como la “*Paired Box*”. Dichos factores son reguladores clave en el desarrollo temprano, y alteraciones en la expresión de estos se piensa que favorecen la transformación neoplásica. En concreto, PAX5 codifica a una proteína activadora específica del linaje B expresada en fases tempranas del proceso de diferenciación del linfocito B, con ausencia de la misma en fases tardías.

PI3Kδ (*Phosphoinositide 3-kinase subunit delta*): kinasa expresada principalmente en los leucocitos. Encargada de la fosforilación de fosfoinosítidos implicados en la respuesta inmune.

PPP4R2 (*Protein Phosphatase 4 Regularory subunit 2*): subunidad reguladora del complejo serina/treonina fosfatasa 4. Además de ser necesaria para la reparación del ADN, este complejo juega un papel en la organización de los microtúbulos en los centrosomas y en el procesamiento de la ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP) que forman el spliceosoma.

RPS15 (*Ribosomal Protein S15*): este gen codifica una proteína que forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma (de 40S). Se ha encontrada activada su expresión en varios tumores.

SF3B1 (*splicing factor 3b subunit 1*): componente del spliceosoma, importante en el proceso postranscripcional de maduración del ARN.

SYK (*Spleen Tyrosine Kinase*): esta proteína se expresa ampliamente en las células hematopoyéticas y está implicado en vías que median diversas respuestas celulares, como la proliferación, diferenciación y fagocitosis.

TP53: este gen codifica una proteína supresora de tumores que presenta dominios de unión a ADN, dominios de oligomerización y de activación de la transcripción. Responde ante estímulos estresantes regulando la expresión de genes diana, favoreciendo procesos de apoptosis, senescencia, arresto del ciclo celular, reparación del ADN o cambios en el metabolismo.

TRAIL/MAP3K4/p38/HSP27/Akt: vía encargada de la regulación de la supervivencia celular tras estímulos apoptóticos.

TTT (*Time to treatment*): tiempo hasta tratamiento, relacionado con el pronóstico de la enfermedad. Aquellos pacientes con pronóstico más desfavorable presentan un TTT más precoz, es decir, menos tiempo hasta la aparición de los síntomas y la necesidad de tratarlos.

ZAP-70 (*Zeta Chain of T cell Receptor Associated Protein Kinase 70*): este gen codifica una enzima que está implicada en el desarrollo del linfocito T y en su activación.

ZNF292 (*Zinc Finger Protein 292*): este gen codifica un factor de transcripción dependiente de hormona de crecimiento que funciona como un gen supresor de tumores.

1. Introducción

1.1 Definición

La LLC es un trastorno linfoproliferativo que afecta a linfocitos B periféricos, siendo la leucemia más frecuente en el mundo occidental. La mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 60 años, raramente apareciendo en la infancia, y existe un predominio superior en varones que en mujeres (2:1), siendo más frecuente en pacientes de raza caucásica, y disminuyendo su prevalencia en otros grupos raciales. Aunque se han reportado peores resultados del proceso asociados a la raza, no han sido confirmados definitivamente por otros estudios. La incidencia de la enfermedad aumenta proporcionalmente a la edad, siendo un diagnóstico infrecuente antes de los 65 años, pero aumentando a partir de dicho rango etario (Fig.1). De la misma forma que con otros tipos de leucemias, el riesgo de muerte asociada a la enfermedad es proporcional a la edad del paciente (4).

El linfoma linfocítico pequeño (o SLL en la lengua anglosajona) es una entidad dentro de la misma enfermedad que se caracteriza por presentar linfadenopatías y sintomatología de LLC en ausencia de infiltración de la médula ósea.

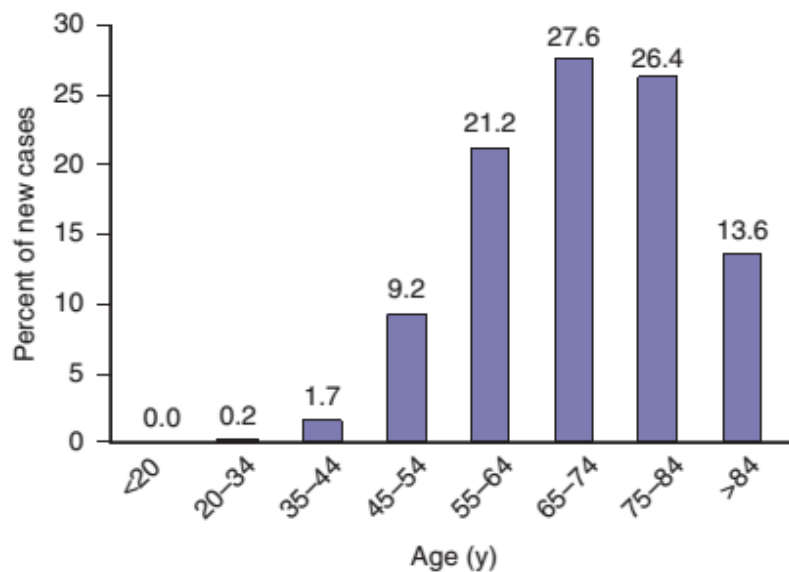


Fig. 1. Incidencia de casos de LLC en función de la edad (4).

A lo largo de los años, numerosos esfuerzos han ido encaminados a comprender la leucemia linfocítica crónica, tanto su fisiopatología, así como sus características clínicas y complicaciones asociadas. En un inicio la LLC fue descrita por Virchow en la década de 1840 en pacientes que mostraban linfadenopatías y leucocitosis. Estudios posteriores mostraron la implicación del bazo y de la médula ósea en la enfermedad, y se introdujo el término “linfosarcoma” en consecuencia (5).

La LLC se presenta como una enfermedad con una heterogeneidad en sus manifestaciones clínicas importante, curso indolente y cuyo tratamiento se reserva para la presencia de síntomas de progresión de la enfermedad (como la insuficiencia de la médula ósea, es decir, estadio III o IV de Rai o estadio C de Binet), de la transformación en un linfoma de alto grado, o los procesos autoinmunes, tanto las citopenias autoinmunitarias como la hipogammaglobulinemia, si estos son refractarios al uso de corticoides o gammaglobulina, respectivamente.

1.2 Factores implicados

Múltiples factores parecen estar relacionados con la presencia de la LLC, como son: el hecho de presentar familiares de primer grado con neoplasias malignas hematológicas como linfomas, leucemias y mieloma; antecedentes de trabajar o vivir en una granja; determinadas profesiones como la de peluquero (esto debido a la presencia de compuestos químicos que consecuentemente aumentan la susceptibilidad al tumor), e historia previa de infección por el virus de la Hepatitis C. Factores que han demostrado ser protectores parecen ser el hábito tabáquico, historia previa de alergias, transfusiones de sangre y la exposición al sol (5). Ahora profundizaremos en aquellos más destacados o que suscitaron más estudios.

1.2.1 Factores ambientales

Estudios de cohortes ocupacionales y estudios de casos y controles han encontrado un riesgo aumentado de LLC debida a exposición a benceno y otros compuestos químicos industriales. Pese a ello, los resultados de dichos estudios no son consistentes. Otros estudios han demostrado que la exposición en la granja a determinados compuestos, como pesticidas, herbicidas, o incluso la exposición a animales es significativa para la aparición de LLC (6).

Además de todo esto, la neoplasia presenta una distribución variable a lo largo del mundo. La incidencia es máxima en Europa y Norteamérica, y mínima en Asia, siendo la diferencia entre estas 40 veces mayor. En el caso de estudios sobre población asiática en Estados Unidos, las tasas eran similares a las de la población en Asia. Por lo que se observa, a diferencia de otros tipos de tumores, el riesgo de padecer LLC no se incrementa en individuos que llegan a E.E.U.U procedentes de países con bajo riesgo. Esto nos deja ver la mayor importancia de los factores genéticos con respecto a los ambientales en el desarrollo de la enfermedad (6).

En lo que respecta a las radiaciones ionizantes, la leucemia linfocítica crónica no se ha definido como un cáncer asociado a radiación, como demuestran estudios en pacientes supervivientes a las bombas atómicas. Sin embargo, ante estos resultados hay que tener en consideración el hecho de ser un cáncer muy raro en Asia, el tiempo prolongado de desarrollo del tumor, las variaciones en la clasificación de la neoplasia entre los diferentes estudios, y la difícil obtención de data procedente de certificados de defunción. Un estudio realizado sobre supervivientes del accidente de la planta nuclear de Chernobyl si demostró un ligero aumento de la incidencia de LLC en dichos pacientes. Además de todo esto, se ha objetivado cierta evidencia al respecto de la radiación asociada a campos magnéticos, en donde se ha visto riesgo de LLC (5,6).

1.2.2 Factores hereditarios

La LLC se considera familiar si existe un familiar de primer grado con la enfermedad. En muestras basadas en la población, aproximadamente el 5% de los pacientes con LLC reportaron antecedentes familiares de leucemia (3). La predisposición familiar es fuerte, con aproximadamente más de un 10% de los pacientes con un familiar de primer o segundo grado con LLC, e incluso pudiendo ser mayor si también consideramos aquellos individuos con MBL (*monoclonal B-cell lymphocytosis*) (5).

En general, los casos familiares tienen un inicio más precoz que los casos esporádicos. Parece ser que también existe un fenómeno de anticipación, en donde las generaciones más jóvenes tienen un inicio más precoz de la enfermedad que generaciones más antiguas. Se han realizado diversos estudios con la intención de establecer las características diferenciales entre los casos de LLC esporádica y familiar, sin obtener diferencias entre ambas (3,6).

Entre los factores genéticos adquiridos, destacan anomalías cromosómicas en los cromosomas 11,12,13 y 17, siendo comunes en la LLC, y siendo capaces de predecir tanto el tiempo hasta necesitar tratamiento de la enfermedad como la supervivencia a esta. Los genes responsables del pronóstico adverso asociados a delección 17p13 y delección 11q22 fueron reconocidos como TP53 y ATM, respectivamente. La delección en 17p13 es más homogénea que cualquier otra alteración *de novo*. Aunque es poco frecuente, mutaciones con pérdida de función de TP53 también pueden suceder en ausencia de la delección, y el riesgo que confieren parece ser el mismo entre ambas (7). La delección en 13q14 es la anomalía citogenética más común y favorable de la LLC. Los genes responsables no estaban claros inicialmente (7). Con respecto a esta alteración, Calin et al., en 2002, estableció que varios microARNs (*miR15* y *miR16* en concreto), secuencias implicadas en la regulación de la traducción del ARNm, así como en su degradación, se encontraban alterados en la mayor parte de casos, manifestándose en la forma de deleciones o siendo regulados a la baja (8). Los microARN (miARN) pueden tener implicaciones muy importantes en el desarrollo del cáncer, no sólo de la LLC, o de otros tipos de neoplasias hematológicas, sino también de diversos tumores sólidos, presentándose como posibles candidatos moleculares para la estimación del riesgo de cáncer (9).

La epigenética parece tener también un papel en la patogénesis de la enfermedad. Los cambios epigenéticos son modificaciones no heredadas que afectan a la transcripción, como la metilación de promotores o la acetilación de ADN unido a histonas. En cuanto a la LLC, se ha descrito la hipometilación generalizada del ADN. Entre el 2 y el 8% de las islas CpG, zonas ricas en pares citosina guanina unidos por fosfatos, formando parte en muchos casos de las regiones promotoras del gen, y que suelen estar desmetilados si existe expresión de este, se encuentran metilados de forma aberrante en la LLC si la comparamos con los linfocitos B normales. Esto puede indicarnos que la metilación del ADN afecta en gran medida al perfil transcripcional de la enfermedad.

1.3 Biología de la LLC e implicaciones clínicas

El desarrollo de los linfocitos B se inicia en la médula ósea, y posteriormente en órganos linfoides secundarios. La fase final de diferenciación a células plasmáticas vuelve a tener lugar en la médula ósea. En primer lugar, las células progenitoras hematopoyéticas se diferencian a linfocitos pro-B, primera célula comprometida en el linaje B. Dicha célula inicia un proceso de evolución a linfocito pre-B, caracterizado por la reorganización de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas y la expresión de cadenas μ en el citoplasma. Posteriormente se establece la expresión de IgM en la superficie celular, evento que es posible por la reorganización de la cadena ligera. En este momento la célula pasa a ser un linfocito B inmaduro. La salida de la médula ósea posterior y la expresión de IgD de superficie etiqueta a estas células como linfocitos B *naïve*. A partir de este momento los linfocitos viajan a órganos linfoides secundarios en donde interactúan con células presentadoras de antígenos, lo que los lleva a activarse y a diferenciarse a centroblastos (llamados así por situarse en los centros germinales de los folículos secundarios), estableciendo un cambio en el isotipo de inmunoglobulina y mutaciones somáticas en la región variable de la Ig que tienen como objetivo aumentar la afinidad de la célula por el antígeno. La expresión de estas nuevas Ig de superficie favorece su diferenciación a centrocitos. Aquellas células que expresen anticuerpos con gran afinidad por el antígeno van a diferenciarse bien a linfocitos B de memoria o bien a plasmablastos, estos últimos viajando nuevamente a la médula ósea para sufrir la diferenciación final a células plasmáticas (10).

Ante toda esta sucesión de eventos, la siguiente pregunta sería en donde quedaría encuadrada la LLC. El origen todavía no está claro, y es posible que nos encontremos ante varias formas de la enfermedad, una originada a partir de linfocitos B inmaduros, de mal pronóstico, y otra cuyo origen se establece en linfocitos B con mayor diferenciación, y por el contrario con mejor pronóstico (10), que se distinguen por la expresión diferencial de genes que van a participar en el proceso de diferenciación.

Existen varias vías de señalización que permiten el desarrollo y la maduración de los linfocitos B. La alteración de estas condiciona una pobre diferenciación y la mayor probabilidad de aparición de enfermedades. Así, por ejemplo, mutaciones en componentes de la vía del BCR se han observado como ejes centrales en la evolución de la LLC, y por eso el desarrollo de nuevos fármacos que tengan como objetivo componentes de estas vías de señalización hace posible un aumento de la supervivencia de los pacientes afectados de esta enfermedad. Es el claro caso de Ibrutinib, Idelalisib o Fostamatinib, inhibidores de kinasas presentes en la vía, las cuales son BTK, SYK y PI3K δ , respectivamente. Además, el estado mutacional de IGHV, ZAP-70 (zeta-associated protein kinase 70) y CCL3 (chemokine ligand 3) se asocian a la unión de autoantígenos y a la función del BCR (11), y son factores pronósticos en la evolución de la LLC que comentaremos a continuación.

Los pacientes con LLC clásicamente se distribuían en dos categorías, dependiendo de si las células tumorales expresaban el BCR con la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGHV) presentando mutaciones (IGHV-mutado) o ausencia de ellas (IGHV-no mutado). Estudios posteriores han permitido identificar otras características que presentan valor pronóstico en estos pacientes (12). El análisis de estos hallazgos que condicionan una mayor o menor agresividad en la neoplasia nos permite entender hasta cierto punto diversos aspectos sobre el comportamiento del tumor durante su evolución. Sin embargo, todavía

estamos muy lejos de comprender los mecanismos que dan origen a la enfermedad, y de saber si tratándose la LLC de una enfermedad con un curso tan heterogéneo, pacientes en su mayoría asintomáticos pero que podrían presentar en un futuro una evolución más desfavorable podrían recibir tratamiento precozmente sin necesidad de que evolucione la enfermedad y de que aparezca la sintomatología. Es necesaria la búsqueda de marcadores predictores de evolución de la enfermedad que nos puedan dar un resultado más fiable de su pronóstico.

1.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la LLC viene definido por los criterios establecidos inicialmente en 2008 por el International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL), y posteriormente actualizados en la edición de 2018, en donde se establece la presencia de un número de linfocitos en sangre periférica igual o superior a $5.10^9/L$ ($\geq 5000/\mu L$), niveles que han de ser mantenidos durante al menos 3 meses. La clonalidad de los linfocitos B ha de ser demostrada a través de citometría de flujo. Es importante asegurarse de que el paciente presenta LLC y no otro tipo de enfermedad linfoproliferativa que puede enmascarar a la primera, tal como la tricoleucemia, o manifestaciones leucémicas de linfoma de células del manto, linfoma esplénico de la zona marginal con linfocitos vellosos circulantes o linfoma folicular (13).

El diagnóstico de LLP (*linfoma linfocítico pequeño*) /SLL (*small lymphocytic lymphoma*) requiere la presencia de linfadenopatías y la ausencia de citopenias por infiltración medular. Además, el número de Linfocitos B periféricos debería de ser $< 5000/\mu L$, y el diagnóstico debe de ser confirmado por análisis histopatológico de biopsias de adenopatías u otros tejidos. Algunos pacientes pueden presentar ganglios linfáticos aumentados de tamaño que no son sospechosos de asociarse a tumores sólidos, y con niveles de linfocitos B inferiores a $5000/\mu L$ que presentan inmunofenotipo característico de LLC. En estos casos, el diagnóstico a través de biopsias tisulares o de ganglios linfáticos puede omitirse al tener consecuencias clínicas limitadas (13).

En ambos casos el diagnóstico de CLL o de LLP se puede sospechar ante un paciente adulto que en un análisis de rutina presente un incremento en el número absoluto de linfocitos B clonales, pero con un recuento de estos de $< 5000/\mu L$. Sin embargo, en ausencia de adenopatías, organomegalias, síntomas o citopenias asociadas a la enfermedad, la presencia de este recuento es indicativo de MBL (*monoclonal B-lymphocytosis*). Es de tener en cuenta también que independientemente del número de linfocitos o de las adenopatías, las citopenias causadas por infiltración de la médula ósea directamente establecen el diagnóstico de LLC. En cuanto a MBL, se ha observado su progresión a LLC, siendo necesario el tratamiento en proporción al 1-2% por año (13).

Las células leucémicas tienen la morfología característica de linfocitos maduros, con citoplasma escaso y núcleo denso con ausencia de nucléolos observables (13). Es de destacar la presencia de manchas de Gumprecht, también llamadas “smudge cells” o “células de frotis”, resultado de alteraciones que sufren algunas de estas células durante el proceso de obtención del frotis (14).

Se tratan de células que coexpresan el antígeno de superficie CD5, además de los antígenos específicos de linfocito B CD19, CD20 y CD23 en el análisis inmunofenotípico. Importante saber que las células leucémicas expresan niveles de CD20 y de CD79b inferiores a los

expresados por linfocitos B normales. Cada clon de linfocitos B está sujeto a la expresión de un solo tipo de cadena ligera, bien Kapa (κ) o bien Lambda (λ). La expresión de CD5 también se observa en otro tipo de neoplasias hematológicas, como puede ser el linfoma de células del manto. Salvo en casos en los que el diagnóstico se ve dificultado por limítrofes con otras entidades, el diagnóstico inmunofenotípico es suficiente con el análisis de CD5, CD19, CD20, CD23, κ y λ (13).

1.5 Manifestaciones clínicas

La mayor parte de los pacientes son asintomáticos al diagnóstico de la enfermedad, y suele detectarse con el hallazgo incidental de linfadenopatías y linfocitosis en un análisis de rutina. Una gran mayoría de pacientes pueden no presentar sintomatología relacionada con la LLC, pero sí pueden llegar a presentar fatiga moderada o leve limitación en actividades del día a día. Un pequeño grupo puede mostrar complicaciones infecciosas recurrentes, en especial las que afectan a vías respiratorias superiores. La enfermedad produce un aumento de la predisposición a padecer infecciones recurrentes, a la aparición de enfermedades autoinmunes y de otros cánceres secundarios, como consecuencia de la supresión del sistema inmune (4,5)

La presencia de sudores nocturnos, fiebre y pérdida de peso importante, conocidos también en conjunto como “Síntomas B”, suele estar presente en pacientes con enfermedad avanzada, así como también signos y síntomas asociados a la anemia, trombocitopenia y linfadenopatías. En cuanto a las adenopatías, estas no estar fijas y o duras, y rara vez ocasionan síntomas de disfunción orgánica o linfedema de miembros. También pueden exacerbarse en caso de surgir un episodio infeccioso agudo, aunque habitualmente remiten tras la resolución de la complicación infecciosa (5).

La esplenomegalia se ve en pacientes con LLC con hiperesplenismo y trombocitopenia asociadas, y a veces puede dar saciedad precoz por el aumento de tamaño del bazo. La hepatomegalia debida a infiltración leucémica es rara. Se ha descrito la infiltración de múltiples órganos, entre ellos riñón, pulmón, espacio pleural y piel, pero esto suele observarse en casos de enfermedad avanzada, y necesitan iniciar el tratamiento para paliar los síntomas. La afectación pulmonar se ha visto asociada a recuentos de linfocitos elevados, y el patrón de afectación suele ser de tipo intersticial. La afectación gastrointestinal se manifiesta en forma de diarrea crónica o deficiencia de hierro secundaria a sangrado crónico o malabsorción. La afectación del sistema nervioso central es rara, y de presentarse suele ser en la forma de cefaleas, confusión, parálisis de pares craneales o meningismo. Debido a deficiencias del sistema inmune, y de forma más común, estos pacientes pueden desarrollar infecciones oportunistas del sistema nervioso central. Los pacientes también presentan típicamente erupciones dolorosas, eritematosas y recurrentes en zonas expuestas de las extremidades, que característicamente al análisis de las biopsias de piel se observa infiltración de poblaciones de linfocitos B y T, además de eosinófilos (5).

1.6 Factores pronósticos

En los últimos años, han salido a la luz nuevas alteraciones que parecen estar relacionadas con una evolución variable del proceso nosológico. Puente et al. descubrió mutaciones

novedosas recurrentes afectando a regiones no codificantes, localizadas en NOTCH1 y PAX5, genes implicados en el desarrollo y diferenciación de los linfocitos B, respectivamente. En el caso de NOTCH1, observó que la mutación estaba situada en el 3'UTR de dicho gen, originando una delección en el exón 34 tras el proceso de splicing que se asoció a un menor tiempo hasta tratamiento y a una menor supervivencia global, de forma similar a las mutaciones codificantes en NOTCH1. En cuanto a PAX5, encontró alteraciones en un enhancer que condicionaban la menor expresión de dicho gen, estableciendo la posibilidad de que estas mutaciones constituyan eventos que participen en el desarrollo de estos tumores (12). Dan A. Landau et al. también encontró mutaciones drivers en RPS15 (proteína ribosomal), no habiendo sido estudiada en demasía en relación con el cáncer, e IKZF3 (factor de transcripción clave en el desarrollo y la diferenciación de los linfocitos B), cuyo aumento en su expresión implica una evolución más desfavorable. Una mayor proporción de estos hallazgos fueron encontrados en casos de LLC con IGHV no mutado, lo que pone de manifiesto la importancia de la caracterización del estado mutacional de IGHV en el pronóstico de los pacientes con LLC. También es interesante cómo a medida que se desarrolla la enfermedad se van superponiendo mutaciones que se establecen de forma precoz y que suelen afectar al clon de células, junto con mutaciones que suceden a un nivel subclonal y que aparecen de forma tardía (15).

Parece claro que los errores en el proceso de maduración del linfocito B condicionan un aumento de las capacidades proliferativas del mismo y en última instancia, una evolución a neoplasia. Estos errores también modifican la evolución de los pacientes afectados, puesto que la presencia o ausencia de determinadas mutaciones se traduce en una menor supervivencia o un menor tiempo hasta tratamiento. De esta forma, conocer estos factores determinantes en la evolución de la LLC puede llegar a ser útil en establecer biomarcadores que condicionen una más pronta actuación sobre pacientes con un pronóstico más desfavorable. Por ejemplo, pacientes con trisomía del cromosoma 12 o delecciones en 17p y 11q se han asociado a un mayor avance de la enfermedad (16), además de que dichas delecciones tienen una mayor concurrencia con mutaciones en TP53 y ATM, respectivamente (15); o polimorfismos en algunos genes como PPP4R2 (implicado en la supervivencia celular y reparación del ADN en células hematopoyéticas y leucémicas) y MAP3K4 (implicada en la vía de TRAIL/MAP3K4/p38/HSP27/Akt) se asociaron a mayor necesidad de tratamiento precoz, mientras que variaciones en genes como RIPK3, gen esencial en el proceso de necroptosis, asociaron tanto necesidad de tratamiento precoz como supervivencia global (17).

Ante estos hallazgos, resulta necesario estratificar el riesgo de progresión de forma más efectiva en estos pacientes, y más aún con la aparición de nuevos tratamientos, como el ibrutinib (18), idelalisib (19), y venetoclax (20), fármacos que han demostrado aumentar el tiempo libre de enfermedad incluso en estadios de peor pronóstico y de los cuales podrían beneficiarse determinados perfiles de pacientes en estadios más precoces. La estadificación clínica de la LLC mediante las clasificaciones de Rai y de Binet nos ha permitido estimar el pronóstico y decidir cuándo iniciar el tratamiento. Disponemos también de otros factores pronósticos que nos pueden ayudar a este objetivo. El LDT (lymphocyte doubling time) indica un peor pronóstico, asociándose a factores como la edad (≥ 65 años), IGHV no mutado, alteraciones citogenéticas desfavorables (del(11q), del(17p)), elevación de la beta2-Microglobulina, y mutaciones en TP53, prediciendo una menor supervivencia (21). Hay que destacar también la expresión aumentada de CD38 en la membrana de los linfocitos, que asocia un pronóstico desfavorable, aunque es de considerar la existencia de variabilidad en la expresión a lo largo de la evolución del proceso nosológico en algunos pacientes (22); la expresión de ZAP-70, gen

que codifica un enzima que forma parte de la familia de las tirosin-kinasas y que juega un papel en el desarrollo de linfocitos T y en la activación de linfocitos B, se correlaciona con el estado mutacional de IGHV, con la progresión de la enfermedad y con la supervivencia (23).

Mosquera Orgueira A et al. (24), mediante el establecimiento de parámetros como el estado mutacional de IGHV, además del análisis de clusters de genes asociados al tiempo hasta necesitar tratamiento (*Time to treatment*, o TTT), estratificó a los pacientes en 4 grupos pronósticos, donde los pacientes que mejor pronóstico presentaban eran aquellos con un perfil transcriptómico de bajo riesgo e IGHV mutada, requiriendo tratamiento durante la evolución de la enfermedad en tan solo un 25% de los casos. El grupo que tuvo la mayor probabilidad de necesitar tratamiento en el primer año tras el diagnóstico fue el que presentó ausencia de mutación en IGHV y un perfil transcriptómico elevado. Esto fue reportado previamente, en estudios como los de Friedman et al. (25) en los que dividió a pacientes con LLC en dos clusters independientemente del estado mutacional de IGHV, y en los que la combinación de esos parámetros con el estado de IGHV mejoraba la capacidad pronóstica con respecto al empleo de un solo marcador. Asimismo, hallazgos similares se han reportado en los estudios de Ferreira et al. (26). Las conclusiones de todos estos trabajos sugieren que el empleo de biomarcadores más fiables mejora la precisión pronóstica y nos abre el camino para poder estimar con mayor exactitud qué pacientes van a tener una evolución más desfavorable y actuar en consecuencia, además de permitirnos comprender todavía mejor el comportamiento de esta enfermedad y poder extrapolarlo a otros procesos de la misma índole, abriendo así nuestras fronteras a una fuente mayor de conocimiento.

1.7 Estadiaje clínico

Los sistemas de estadiaje de Rai y de Binet se han empleado durante mucho tiempo (Tablas 1a y 1b). Estos sistemas están basados en la valoración de la enfermedad a través de la presencia de linfadenopatías y esplenomegalia demostrada en la exploración física, además de las citopenias, y permanecen hoy en día como parte importante y complementaria al análisis molecular. La biopsia y el aspirado de médula ósea no se requieren de rutina en el diagnóstico inicial y manejo de la LLC. Para determinar la etiología de la anemia y la trombocitopenia, que frecuentemente se pueden asociar a trastornos autoinmunes concomitantes, es útil el empleo de la biopsia medular. También se realizaría de forma ideal al inicio de la terapia para valorar la extensión de la enfermedad y para detectar cualquier característica atípica (5).

La tomografía computarizada tampoco se realiza de rutina en la evaluación inicial y los sistemas de estadiaje dependen de los hallazgos en la exploración física. Los escáneres de rutina para el seguimiento de la enfermedad y de su extensión no se emplean en la LLC. Deberían de realizarse, eso sí, en pacientes con sintomatología y previamente a la terapia de inicio. De forma similar, la tomografía por emisión de positrones (PET) no cumple un papel en el manejo rutinario de estos pacientes. Característicamente, los ganglios linfáticos en la LLC carecen de avidéz por la fluorodesoxiglucosa (F18-FDG). Para la identificación de pacientes con *transformación de Richter* (transformación de la leucemia linfocítica crónica en un linfoma agresivo de crecimiento rápido) sí se emplea, presentando una sensibilidad elevada y un valor predictivo negativo (5).

Estadio al diagnóstico	Nivel de riesgo	Estadio de Rai al diagnóstico	Proporción de pacientes que no requieren terapia	Mediana de supervivencia (meses)
0	Bajo	Solo linfocitosis $>5.10^9$	59	150
1	Intermedio	Linfocitosis + adenopatías	21	101
2	-	Linfocitosis + Hepato/esplenomegalia ± adenopatías	23	71
3	Alto	Linfocitosis + anemia (niveles de Hb <11 g/dL) ± Hepato/esplenomegalia o adenopatías	5	19
4	-	Linfocitosis + Trombocitopenia ($<100.10^{12}$ /L ± adenopatías) o Hepato/esplenomegalia	0	19

Tabla 1a. Estadiaje de Rai modificado (5).

Estadio al diagnóstico	Estadio de Rai equivalente	Estadio de Rai al diagnóstico	Proporción de pacientes	Supervivencia media (años)
A	0-2	Solo linfocitosis $>5.10^9$ /L con <3 áreas ganglionares afectadas; ausencia de anemia o trombocitopenia	15	+12
B	1-2	Linfocitosis $>5.10^9$ /L + ≥ 3 áreas ganglionares; ausencia de anemia o trombocitopenia	30	7
C	3-4	Linfocitosis $>5.10^9$ /L + anemia (Hb <10 g/dL) o trombocitopenia ($<100.10^{12}$ /L) independientemente del número de áreas ganglionares afectadas	55	2

Tabla 1b. Estadiaje de Binet (5) Las áreas ganglionares tenidas en cuenta son: ganglios axilares, cervicales e inguinales, tanto unilaterales como bilaterales, bazo e hígado.

1.8 Tratamiento

Los criterios para el inicio de la terapia varían dependiendo de si el paciente se trata en contexto de un ensayo clínico o no (Tabla 2). Generalmente los pacientes en fases iniciales (es decir, estadio A de Binet o 0 de Rai) de la enfermedad deberían de ser monitorizados sin precisar terapia, a no ser que se evidencie progresión de la enfermedad o síntomas asociados con el proceso neoplásico (13). Este proceder se explica por varios estudios que no demostraron una mejoría de la supervivencia en pacientes asintomáticos que fueron sometidos a terapia con Clorambucilo, fármaco que inicialmente se empleó como tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, hay que tener en cuenta que dicho compuesto logra remisión completa en una minoría de pacientes. Resultados similares fueron encontrados con la Fludarabina, e incluso la quimioinmunoterapia con Fludarabina, Ciclofosfamida y Rituximab no demostró ventajas en la supervivencia global. Hay que tener en consideración que los pacientes con alto riesgo muestran una mayor frecuencia de células neoplásicas con IGHV-no mutado, presentando una resistencia aumentada a la quimioterapia. Por lo tanto, el problema del tratamiento precoz ha de ser abordado de nuevo, en especial en los casos de riesgo elevado con marcadores biológicos o moleculares que predicen un peor pronóstico a largo plazo, y más aún con la llegada de fármacos inhibidores de kinasa que pueden asociarse a toxicidad limitada (4).

En esencia, una terapia precoz con fármacos antileucémicos, incluyendo los antagonistas inhibidores de BCL2 en monoterapia o en combinación con anticuerpos monoclonales no está indicada actualmente. A pesar de que pacientes con riesgo intermedio (estadios 1 y 2) y riesgo elevado (estadios 3 y 4) de acuerdo con la clasificación de Rai modificada y en estadios B y C de Binet se beneficiarían de la iniciación del tratamiento, algunos de estos pacientes (sobre todo con el riesgo intermedio de Rai o el estadio de Binet B) pueden monitorizarse sin terapia hasta evidencia de enfermedad sintomática o progresiva.

	Práctica habitual	Ensayo clínico
Tratamiento con estadio 0 de Rai	No indicado	En función del ensayo
Tratamiento con estadio A de Binet	No indicado	En función del ensayo
Tratamiento con estadio B de Binet o estadio 1 o 2 de Rai	Posible	Posible
Tratamiento con estadio C de Binet o estadio 3 o 4 de Rai	Sí	Sí
Tratamiento de la enfermedad activa/progresión	Sí	Sí
Tratamiento en ausencia de enfermedad activa/progresión	No	En función del ensayo

Tabla 2. Recomendaciones de tratamiento en la LLC (13). En algunos ensayos clínicos puede plantearse el tratamiento en fases iniciales con fármacos novedosos a estudio.

La enfermedad activa debería de estar documentada de forma clara para el inicio de la terapia. Al menos uno de los siguientes criterios debería de tenerse en cuenta (13):

1. Evidencia de fallo medular progresivo establecido por el desarrollo o el empeoramiento de la anemia y/o trombocitopenia. Niveles de hemoglobina $<10\text{g/dL}$ o conteos plaquetarios por debajo de $100 \cdot 10^9/\text{L}$ se consideran indicación del inicio de la terapia. Sin embargo, en algunos pacientes estos niveles de plaquetas pueden permanecer estables durante mucho tiempo y no necesariamente implica que se deba iniciar el tratamiento.
2. Esplenomegalia masiva ($\geq 6\text{cm}$ por debajo del reborde costal), progresiva o sintomática.
3. Ganglios masivos ($\geq 10\text{cm}$ en su diámetro mayor), progresivos o sintomáticos.
4. Linfocitosis progresiva con un incremento de $\geq 50\%$ en un periodo de dos meses, o un LDT (lymphocyte doubling time) inferior a seis meses. El LDT puede ser obtenido a través de la regresión lineal de conteos linfocitarios absolutos extraídos a intervalos de 2 semanas durante un periodo de observación de 2 a 3 meses. Los pacientes con conteos iniciales de $<30 \cdot 10^9/\text{L}$ pueden requerir un tiempo mayor de observación para obtener el LDT. Factores que pueden explicar la linfocitosis a parte de la LLC han de ser excluidos (infecciones, administración de corticoides).
5. Complicaciones autoinmunes incluyendo anemia o trombocitopenia refractarias a corticoterapia.
6. Afectación extranodal sintomática o funcional (por ejemplo, piel, riñón, pulmón, médula espinal).
7. Síntomas asociados a la enfermedad, definidos como:
 - a. Pérdida de peso no intencionada superior al 10% en los 6 meses previos.
 - b. Astenia significativa (ECOG ≤ 2 ; incapacidad para realizar actividades rutinarias o trabajar).
 - c. Fiebre $\geq 38^\circ\text{C}$ durante 2 o más semanas sin evidencia de infección.
 - d. Sudoración nocturna durante un mes sin evidencia de infección.

La hipogammaglobulinemia o la paraproteinemia monoclonal u oligoclonal no constituyen por sí solas una condición de inicio de terapia. Sin embargo, es recomendable valorar los cambios en estas anomalías proteicas si los pacientes van a recibir tratamiento. Además de todo esto, los pacientes pueden presentar un conteo leucocitario significativo, pero es rara la leucostasis (leucocitosis sintomática) en la LLC. Es por eso por lo que la sola presencia de conteos elevados no es justificación suficiente para el inicio del tratamiento.

2. Objetivos

Recientemente, se ha caracterizado la hipermutación somática del gen codificante de la región constante de las cadenas ligeras Kappa de las inmunoglobulinas (IGKC) como un marcador pronóstico novedoso en la LLC. La presencia de mutaciones reportó un tiempo hasta el tratamiento más prolongado, independientemente de factores como el estado de IGHV, del sexo, y del estadio clínico en el momento del diagnóstico. Además, se detectó una asociación con una supervivencia global mayor en estos pacientes (27). Asociado todo esto a la evidencia previa que se ha recogido a lo largo de los años acerca del papel de la presencia de la mutación en la cadena pesada, se permitió establecer cuatro grupos pronósticos empleando estas variables, tanto el estado de IGHV como el de IGKC, cada uno de ellos con diferentes perfiles de riesgo. Nuevamente, aquellos con mejor pronóstico eran los que presentaban no sólo mutaciones en la cadena pesada, sino que también en la ligera.

En el presente estudio intentaremos completar la caracterización de los grupos pronósticos propuestos en el estudio ya mencionado, con la finalidad de formular preguntas que puedan ser respondidas en el futuro en posteriores investigaciones.

3. Metodología

Hemos empleado la misma cohorte de pacientes del estudio del grupo de Mosquera Orgueira et al. (27), dividiendo estos en los cuatro grupos pronósticos establecidos en dicho estudio. Los grupos han sido etiquetados como Grupo Pronóstico 1 (IGHV-mutado, IGKC-mutado), Grupo pronóstico 2 (IGHV-mutado, IGKC- no mutado), Grupo Pronóstico 3 (IGHV-no mutado, IGKC-mutado) y Grupo Pronóstico 4 (IGHV- no mutado, IGKC-no mutado). Al mismo tiempo, analizamos cuántos de esos casos presentan mutaciones en regiones codificantes en genes de nuestro interés, a saber: ATM, BIRC3, TP53, SF3B1, ZNF292, NOTCH1, IGKJ1, IGKJ2, IGKJ3, IGKJ4 e IGKJ5.

Partimos de dos bases de datos, una en la que se recogían los casos, con características como el sexo, el estado del paciente, la edad en la que inició el estudio y a la que lo finalizó, la edad en la que se produjo la recaída de la enfermedad, la clasificación de Binet, las características del tumor y el estado mutacional de IGHV, entre otros; y otra base de datos en donde vienen recogidos los genes de dichos casos y sus variantes, reportando unas 28350 en total. Nos centramos en el estado mutacional de IGHV y la presencia y ausencia de mutaciones en IGKC y en los genes anteriormente mencionados. Para facilitar el manejo de la información, colapsamos ambas bases de datos estableciendo una matriz binaria en donde la presencia de una variante como mínimo en cada caso se representa como “1” y la ausencia de variantes como “0”. Sólo nos interesa saber si existen variantes en cada caso, no su número. Descartamos, eso sí, aquellas variantes que implicaban mutaciones en regiones no codificantes de proteína en los genes a estudio, y sólo nos hemos centrado en las mutaciones que conllevan cambios en la proteína resultado. También nos interesan alteraciones específicas en determinados genes, como son ATM y BIRC3, en donde hemos comprobado si las variantes eran debidas a deleciones en el brazo largo del cromosoma 11 (11q); y para ZNF292 junto con la presencia de variantes debidas a deleciones en el brazo largo del cromosoma 6 (6q), puesto que también se analiza en el estudio de Puente et al (12), asociándose a una peor evolución.

Se ha hecho la comparativa entre presentar mutación y no presentarla entre los diferentes grupos pronósticos, mediante el uso de tests exactos de Fisher para cada una de las combinaciones posibles en cada gen a estudio, siendo seis sin tener en cuenta las repeticiones de estas: GP1 frente a GP2; GP1 frente a GP3; GP1 frente a GP4; GP2 frente a GP3; GP2 frente a GP4 y GP3 frente a GP4. El nivel de significación estadística se ha establecido en un p-valor < 0,05, con una confianza del 95%. Para la realización del análisis se ha empleado el programa estadístico R, a través de Rstudio®. Destacaremos además aquellos resultados con un p-valor < 0,001.

4. Análisis

4.1 Análisis descriptivo

De 504 casos de la cohorte de pacientes, 316 presentaban mutaciones en IGHV, 177 carecían de mutaciones, y sólo 10 presentaban un estado mutacional indeterminado (Fig. 2a). Un caso fue caracterizado como biclonal. En cuanto a las características de la hipermutación somática del gen codificante de la región constante de las cadenas ligeras Kappa de las inmunoglobulinas (IGKC), nos hemos encontrado con 189 casos en los que dicho gen se encontraba mutado. Al relacionar ambos genes e incluirlos en los diferentes grupos pronósticos, distinguimos que 170 casos se incluyen en el grupo pronóstico 1; 146 casos del grupo pronóstico 2; 15 casos en el grupo pronóstico 3 y finalmente, 162 casos formando parte del grupo pronóstico 4. Tanto los 10 casos indeterminados como el caso biclonal se han descartado en este análisis, quedando en total 493 casos a estudio (Fig. 2b). El 64,09% forman parte de los grupos de mejor pronóstico, mientras que el resto (35,9%) están incluidos en los grupos de peor pronóstico. El grupo con el menor número de casos fue el grupo pronóstico 3, de tan sólo un 0,026%.

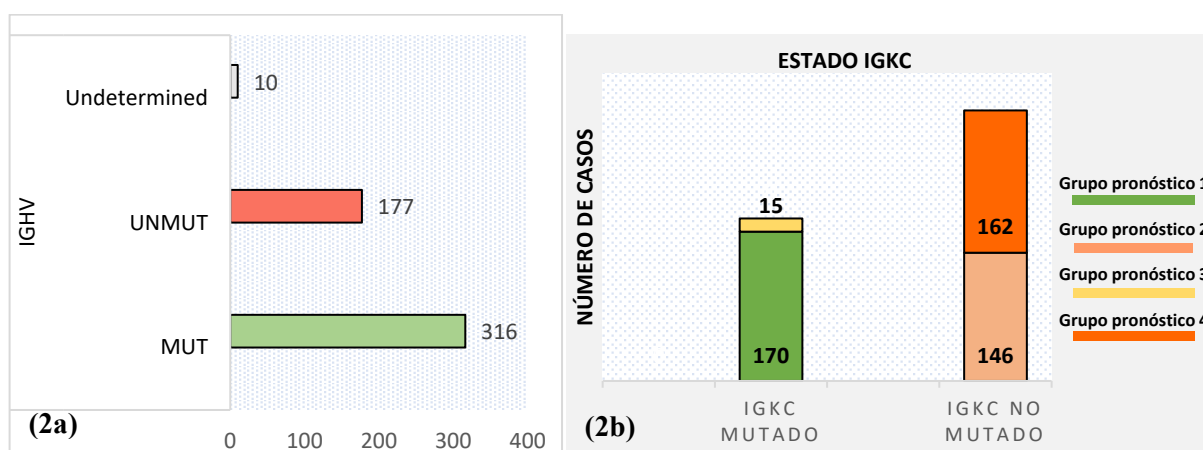


Fig. 2. Distribución de la cohorte de pacientes. **2a:** se observa el número de casos en función del estado mutacional de IGHV. Quedan descartados aquellos casos etiquetados como “Undetermined”. **2b:** añadiendo como variable el estado mutacional de IGKC, la cohorte queda dividida en cuatro grupos pronósticos. Los grupos situados en la parte inferior de cada una de las columnas se corresponden con aquellos que mejor pronóstico se ha visto que tienen, los de la parte superior son los de pronóstico peor.

Hemos seleccionado también de la base de datos varios genes que presenten mutaciones en regiones codificantes y se asocien a modificación de la proteína resultante, entre ellos: SF3B1 con 33 casos; NOTCH1 con 15 casos; TP53 con 8 casos; 9 casos de BIRC3 mutado; 18 de ATM y 14 casos de ZNF292. Incluimos también aquellos genes asociados con la región J del dominio variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina kappa (IGKJ), encontrando 9 casos de IGKJ1; 20 casos de IGKJ2; 36 casos de IGKJ3; 39 casos de IGKJ4 y 36 casos de IGKJ5 mutada (Tabla 3). La distribución de los diferentes genes en función de los grupos pronósticos se muestra en la Fig.4. La presencia de deleciones de 11q en ATM y BIRC3, y deleciones de 6q en ZNF292 también fue analizada, observando los siguientes hallazgos: para ATM, encontramos 3 casos (16,6%) con dicha alteración, uno de los cuales formando parte del grupo pronóstico 2 y dos casos al grupo de peor pronóstico. En el caso de BIRC3, 5 casos se observaron (55,5%) asociados a los grupos 3 (1 caso) y 4 (4 casos). Hace tiempo que se conoce el papel de dicha deleción en el pronóstico de la LLC (28). Finalmente, ZNF292 es el que mostró más casos con la deleción en 6q, con 9 resultados (64,28%), de los cuales 7 forman parte del grupo 4, y 1 a cada uno de los grupos 1 y 3 (Fig. 4).

	CASOS	IGHV STATUS	
SF3B1	33	MUT	13
		UNMUT	20
NOTCH1	15	MUT	1
		UNMUT	14
TP53	8	MUT	4
		UNMUT	4
BIRC3	9	MUT	1
		UNMUT	8
ATM	17	MUT	4
		UNMUT	13
ZNF292	14	MUT	3
		UNMUT	11
IGKJ1	8	MUT	7
		UNMUT	1
IGKJ2	20	MUT	19
		UNMUT	1
IGKJ3	36	MUT	35
		UNMUT	1
IGKJ4	39	MUT	37
		UNMUT	2
IGKJ5	36	MUT	34
		UNMUT	2

Tabla 3. Número de casos con las mutaciones a estudio. También se muestra la presencia o ausencia de mutaciones en IGHV. Los casos que presentan IGHV-no mutado mayoritariamente se muestran en color anaranjado. Los casos en los que IGHV-mutado es más frecuente se presentan de color amarillo.

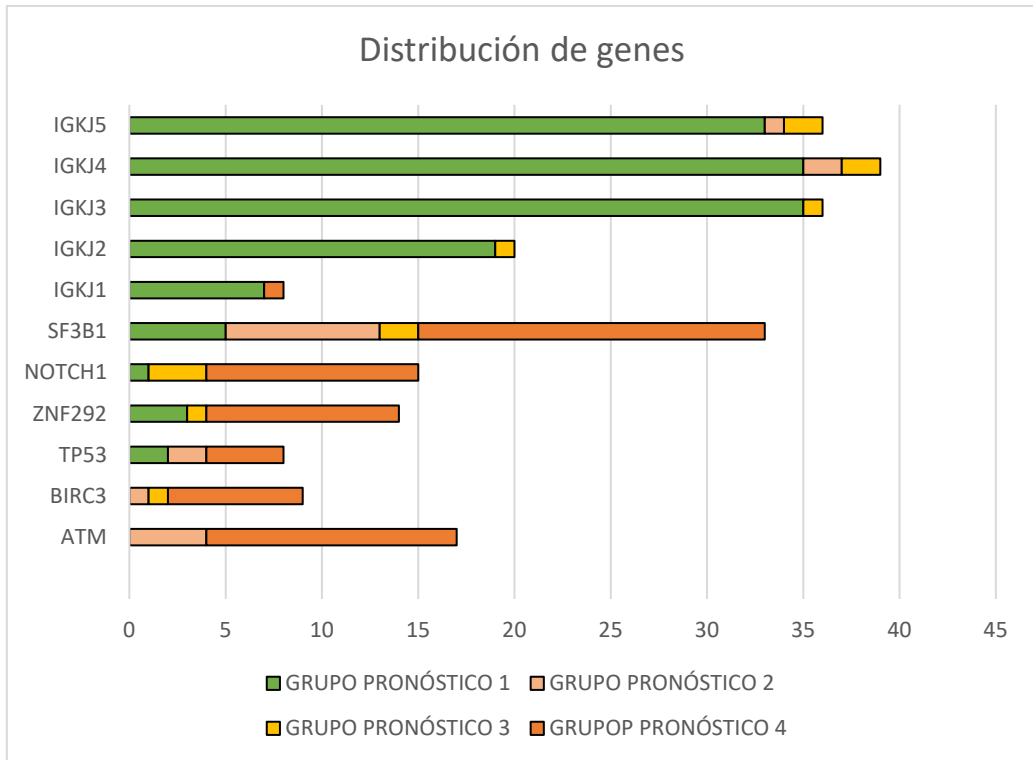


Fig 3: distribución de genes en función de los grupos pronósticos. Se evidencia que aquellos genes asociados a mejor pronóstico son los que forman parte de IGKJ, mientras que el resto de los genes parecen ser más frecuentes en los grupos de pronóstico más desfavorable.

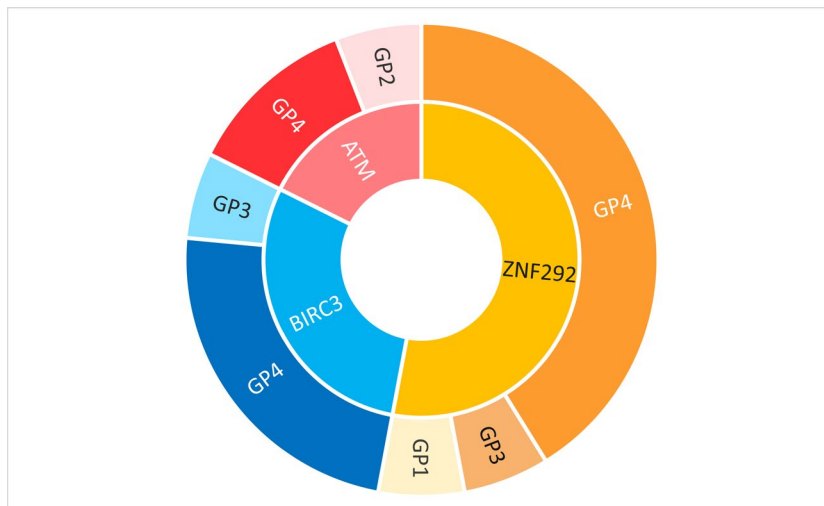


Fig. 4. Representación visual del número de casos con las deleciones a estudio. Se observa que tanto en la del(11q) para ATM y BIRC3, así como en la del(6q) para ZNF292, la mayor parte de los casos corresponden a los grupos de peor pronóstico, en especial al Grupo Pronóstico 4. GP1: grupo pronóstico 1; GP2: grupo pronóstico 2; GP3: grupo pronóstico 3; GP4: grupo pronóstico 4.

4.2 Análisis comparativo

Encontramos resultados estadísticamente significativos comparando la presencia o ausencia de los genes a estudio entre los respectivos grupos pronósticos. Los resultados del análisis están reflejados en la Tabla 4. Hemos realizado también la misma tabla, pero apuntando aquellos valores que han presentado un resultado con un p -valor $< 0,001$ (Tabla 5). Para ATM, se encontró una frecuencia mayor de variantes en el grupo pronóstico 4 con respecto al grupo de mejor pronóstico. Esta diferencia fue muy significativa (p -valor = $6,88 \cdot 10^{-5}$). Obtuvimos hallazgos similares para BIRC3, estando más enriquecido en pacientes con pronóstico desfavorable. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a TP53, posiblemente por falta de datos suficientes. ZNF292 se encontró mayoritariamente en el grupo pronóstico 4 en comparación con el grupo 2. De la misma forma, BIRC3 fue mayoritario en el grupo 4 con respecto al grupo 1. Esto viene a explicar que los genes que se asocian a peor pronóstico característicamente van a encontrarse mutados en aquellos grupos en los que no existen mutaciones en IGHV, en IGKC, o en ambos.

NOTCH1 fue el que mostró más resultados. Las mutaciones en los grupos 3 y 4 fueron más frecuentes que en el grupo 1. En cuanto al grupo 2 con respecto al 3 y al 4, los resultados mostraron que las variantes estaban más enriquecidas en los grupos de peor pronóstico, siendo estos hallazgos muy significativos (p -valor = $0,0006665$ y p -valor = $0,0009427$, respectivamente). Interesa la relación existente entre los grupos 2 y 3, puesto que, al ser los grupos de pronóstico intermedio, el encontrar diferencias entre ellos puede ser útil de cara a definir mejor sus características distintivas.

Las mutaciones asociadas a la región J del dominio variable de las inmunoglobulinas también han asociado resultados significativos. Todos los genes mostraron una mayor frecuencia de aparición de variantes en el grupo pronóstico 1, diferenciándose del grupo pronóstico 2. Los hallazgos fueron muy significativos para IGKJ2, IGKJ3, IGKJ4, IGKJ5. De la misma forma, el grupo pronóstico 4 tenía menos frecuencia de dichas mutaciones. Destacan los genes IGKJ4 e IGKJ5, en especial en la mayor frecuencia de mutaciones entre el grupo 3 y el grupo 4. IGKJ5 también presentó diferencias entre el grupo 2 y el 3, siendo significativa la mayor presencia de las variantes en el grupo 3 (Tabla 4). Parece que la aparición de mutaciones en las isoformas de IGKJ es más frecuente en los grupos en los que IGKC se encuentra mutado, por lo que existe la posibilidad de que las dos mutaciones se encuentren mutadas de forma concurrente.

	GP1V2	GP1V3	GP1V4	GP2V3	GP2V4	GP3V4
ATM	NO	NO	SI	NO	NO	NO
BIRC3	NO	NO	SI	NO	NO	NO
TP53	NO	NO	NO	NO	NO	NO
ZNF292	NO	NO	NO	NO	SI	NO
SF3B1	NO	NO	SI	NO	NO	NO
NOTCH1	NO	SI	SI	SI	SI	NO
IGKJ1	SI	NO	NO	NO	NO	NO
IGKJ2	SI	NO	SI	NO	NO	NO
IGKJ3	SI	NO	SI	NO	NO	NO
IGKJ4	SI	NO	SI	NO	NO	SI
IGKJ5	SI	NO	SI	SI	NO	SI

p<0,001

p<0,05

p>0,05

Tabla 4. Resultados de la prueba exacta de Fisher. En naranja están representadas las comparaciones con resultados no significativos (p-valor>0,05). En verde aquellas comparaciones que han dado resultados significativos (p-valor<0,05). El aumento en la intensidad del verde en algunos casos se explica por ser aquellos resultados con un p-valor<0,001.

	GP1V2	GP1V3	GP1V4	GP2V3	GP2V4	GP3V4
ATM	-	-	6,88E-05	-	-	-
BIRC3	-	-	-	-	-	-
TP53	-	-	-	-	-	-
ZNF292	-	-	-	-	-	-
SF3B1	-	-	-	-	-	-
NOTCH1	-	-	-	0.0006665	0.0009427	-
IGKJ1	-	-	-	-	-	-
IGKJ2	4,90E-06	-	2,46e-06	-	-	-
IGKJ3	7,01E-11	-	1,15E-11	-	-	-
IGKJ4	2,05E-08	-	1,15E-11	-	-	-
IGKJ5	5,27E-09	-	5,57E-11	-	-	-

Tabla 5: misma tabla que en el caso anterior, pero destacando los p-valores de aquellas comparaciones con resultados muy significativos (p-valor <0,001).

5. Discusión

El principal objetivo de este estudio era profundizar en la caracterización de grupos pronósticos en pacientes con LLC empleando como variables el estado mutacional de IGHV y de IGKC, tal y como se había realizado con anterioridad (27), las cuales se comparaban con genes de nuestro interés y que en estudios anteriores han demostrado asociarse a una mala evolución de la enfermedad. Nos interesaba en especial establecer diferencias significativas entre los grupos de pronóstico intermedio, para de esta forma definir con mayor exactitud las características que son únicas de cada uno de ellos. Para ello, hemos realizado un análisis comparativo a partir de una cohorte de pacientes con LLC en los que se han obtenido datos de multitud de variantes genéticas, de las cuales hemos seleccionado aquellas que son de nuestra conveniencia para el estudio. Hemos encontrado varios resultados significativos y que ponen de manifiesto las diferencias existentes entre grupos.

En primer lugar, variantes en genes como ATM y BIRC3, en los que se ha visto con anterioridad su asociación con una menor supervivencia, se han encontrado con mayor frecuencia en el grupo 4, hallazgo esperable si tenemos en cuenta que dicho grupo es el de peor evolución. De la misma forma, SF3B1 se encontró más enriquecido en este grupo. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en TP53, resultado que a priori puede estar sujeto a error por la falta de casos suficientes. Esto se justifica debido a la evidencia recogida anteriormente acerca de cómo las mutaciones en TP53 o la delección en 17p conferían un peor pronóstico a estos pacientes (29), por lo que no se descarta esta posible asociación con los grupos 3 y 4. Destaca además NOTCH1, en donde se encontraron más evidencias estadísticamente significativas. Se observa claramente una frecuencia mayor en los grupos 3 y 4 si se compara con los grupos de mejor pronóstico. Es importante mencionar que la comparación entre el grupo 2 y 3 fue muy significativa, lo que pone de manifiesto una posible entrada a la diferenciación de los grupos intermedios, siendo necesarios estudios sucesivos para demostrar si esta expresión diferencial es útil en su caracterización. En resumen, variantes que en estudios previos habían estado relacionadas con un peor pronóstico se han encontrado con mayor frecuencia en el grupo 4 según nuestro análisis.

En cuanto a las variantes asociadas a IGKJ, todas demostraron estar enriquecidas en los grupos de mejor pronóstico, en especial el grupo 1. Parece que las mutaciones en los diferentes genes de IGKJ se encuentran con frecuencia mayor en los grupos en los que se observa bien mutado el IGHV, o bien el IGKC, siendo esta mayor de encontrarse ambos genes mutados. La presencia de variantes en estos genes parece querer indicar que durante el desarrollo del linfocito B, la hipermutación somática implica un paso más en el proceso madurativo de la célula, y que dependiendo en dónde se haya establecido el punto de inflexión en la aparición de la neoplasia, esta maduración condiciona la agresividad del tumor. De esta forma, el presentar mutaciones en IGHV, IGKC o IGKJ nos habla de mayor diferenciación, y por tanto de mejor pronóstico. Recordemos que las células neoplásicas en esta enfermedad se hayan en una fase de *stand-by* celular, es decir, en la fase G0 o G1 temprana del ciclo celular, por lo que el punto en la línea evolutiva en donde se establece la parada marca el comportamiento de la célula.

El dividir a los pacientes en cuatro grupos pronósticos puede resultar beneficioso a la hora de establecer una mejor toma de decisiones a nivel clínico, puesto que hay situaciones en las

que los pacientes tienen características *borderline* y afinar mejor en estos puede mejorar la supervivencia e ir un paso por delante de la enfermedad. Al final, nos encontramos ante una gama de grises, un espectro dentro de una misma patología, y definir a este como blanco o negro reporta una disminución de la precisión a la hora de enfrentarnos a pacientes con esta enfermedad.

6. Conclusiones

Nuestro análisis de los diferentes grupos pronósticos objetivó una presencia mayor de genes asociados a mal pronóstico en los grupos etiquetados como de mal pronóstico, hallazgos que a priori son esperables teniendo en cuenta el conocimiento previo de otros estudios. NOTCH1 se vio enriquecida en los grupos intermedios, y pone de manifiesto una posible vía hacia el estudio de este gen como posible marcador de dichos grupos, siendo necesarias investigaciones posteriores para comprobar si estos resultados son sólidos. Finalmente, las formas de IGKJ se encontraron más enriquecidas en los grupos de pronóstico favorable.

Referencias bibliográficas

1. Mayr C. What are 3' utrs doing? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2019 Oct 1;11(10).
2. Janeway CA, Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 6th ed. New York: Garland Science Publishing; 2005. 135–139.
3. Goldin LR, Slager SL, Caporaso NE. Familial chronic lymphocytic leukemia. Vol. 17, *Current Opinion in Hematology*. 2010. p. 350–5.
4. Farrukh T. Awan, John C. Byrd. Chronic lymphocytic leukemia. In: Ronald Hoffman, Edward J. Benz Jr, Leslie E. Silberstein, Helen E. Heslop, Jeffrey I. Weitz, John Anastasi, et al., editors. *Hematology: basic principles and practice*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2018. p. 1244–64.
5. T. Awan F, C. Byrd J. Chronic Lymphocytic Leukemia. In: Kaushansky K, T. Prchal J, W. Press O, A. Lichtman M, Levi M, J. Burns L, et al., editors. *Williams Hematology*. 9th Edition. New York: McGraw-Hill Education; 2016. p. 1527–51.
6. Goldin LR, Slager SL. Familial CLL: Genes and Environment [Internet]. 2007. Available from: http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2007/1/339/646340/339_345ash.pdf
7. Lanasa MC. Novel Insights into the Biology of CLL [Internet]. Available from: <http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2010/1/70/1492806/bep0011000070.pdf>
8. Adrian Calin G, Dan Dumitru C, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [Internet]. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.242606799
9. Nicoloso MS, Kipps TJ, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. Vol. 139, *British Journal of Haematology*. 2007. p. 709–16.
10. García-Muñoz R, Galiacho VR, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. Vol. 91, *Annals of Hematology*. 2012. p. 981–96.
11. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends in Immunology*. 2013 Dec;34(12).
12. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015 Oct 22;526(7574):519–24.
13. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018 Jun 21;131(25).
14. Kumar V, K. Abbas A, C. Aster J, editors. *Enfermedades de los leucocitos, ganglios linfáticos, bazo y timo*. In: *Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional*. 9ª. Barcelona: Elsevier; 2015. p. 593–4.
15. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015 Oct 22;526(7574):525–30.
16. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2000 Dec 28;343(26).
17. Mosquera Orgueira A, Antelo Rodríguez B, Alonso Vence N, Díaz Arias JÁ, Díaz Varela N, Pérez Encinas MM, et al. The association of germline variants with chronic lymphocytic leukemia outcome suggests the implication of novel genes and pathways in clinical evolution. *BMC Cancer*. 2019 May 29;19(1).

18. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2015 Dec 17;373(25).
19. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 May 29;123(22).
20. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2016 Jan 28;374(4).
21. Baumann T, Moia R, Gaidano G, Delgado J, Condoluci A, Villamor N, et al. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia modern era: a real-life study in 848 unselected patients. *Leukemia*. 2021 Feb 4;
22. Thompson PA, Tam CS. CD38 expression in CLL: a dynamic marker of prognosis. *Leukemia & Lymphoma*. 2014 Jan 7;55(1).
23. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia [Internet]. Vol. 18, *N Engl J Med*. 2003. Available from: www.nejm.org
24. Orgueira AM, Rodríguez BA, Vence NA, López ÁB, Arias JÁD, Varela ND, et al. Time to treatment prediction in chronic lymphocytic leukemia based on new transcriptional patterns. *Frontiers in Oncology*. 2019;9(FEB).
25. Friedman DR, Weinberg JB, Barry WT, Goodman BK, Volkheimer AD, Bond KM, et al. A Genomic Approach to Improve Prognosis and Predict Therapeutic Response in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2009 Nov 15;15(22).
26. Ferreira PG, Jares P, Rico D, Gomez-Lopez G, Martinez-Trillos A, Villamor N, et al. Transcriptome characterization by RNA sequencing identifies a major molecular and clinical subdivision in chronic lymphocytic leukemia. *Genome Research*. 2014 Feb 1;24(2).
27. Mosquera Orgueira A, Antelo Rodríguez B, Díaz Arias JÁ, Bello López JL. Identification of new putative driver mutations and predictors of disease evolution in chronic lymphocytic leukemia. Vol. 9, *Blood Cancer Journal*. Nature Publishing Group; 2019.
28. Neilson J, Auer R, White D, Bienz N, Waters J, Whittaker J, et al. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia*. 1997 Nov 18;11(11).
29. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 Oct 10;28(29):4473–9.