

Factores clínicos y biológicos relacionados con la transformación de la leucemia linfática crónica en linfoma difuso de células grandes B

Clinical and biological factors related to the transformation of chronic lymphocytic leukemia into diffuse large B-cell lymphoma

Fuente ML

Instituto Alexander Fleming – Hospital Italiano de Buenos Aires

mluciafuente@gmail.com

Monografía premiada de alumnos del curso superior de Hematología año 2014-2015

Fecha de recepción: 28-10-2016
Fecha de aprobación: 01/12/2016



ARTÍCULO
DE REVISIÓN

HEMATOLOGÍA
Volumen 20 n° 3: 309 - 322
Septiembre - Diciembre 2016

Palabras clave: Síndrome de Richter,
Leucemia linfática crónica,
Transformación.

Keywords: Richter Syndrome,
Chronic lymphocytic leukemia,
Cell transformation.

Resumen

La leucemia linfática crónica puede presentar en su evolución transformación a un linfoma de alto grado, frecuentemente a linfoma difuso de células grandes B relacionado clonalmente. Se conoce a este evento como síndrome de Richter. El PET/TC, con alto valor predictivo negativo, permite seleccionar en qué sitio se debe tomar la biopsia para realizar el diagnóstico. El tamaño ganglionar mayor a 3 centímetros y el estadio RAI III-IV, la presencia del gen IgVH no mutado, determinados receptores estereotipados, la expresión CD38, ZAP70, CD49d, mutaciones somáticas como la delección CDKN2A

y las mutaciones NOTCH1, algunos polimorfismos genéticos y el antecedente de haber recibido tratamiento quimioterápico son factores asociados con el riesgo de transformación. Se cree que la infiltración ganglionar extensa favorecida por el microambiente sería un requisito fundamental para la misma. Existen tres mecanismos genéticos que provocarían la transformación, y las mutaciones adquiridas del gen TP53 son las más frecuentes. Probablemente, los polimorfismos genéticos explicarían la alta agresividad y baja tasa de respuesta de esta enfermedad.

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia can suffer transformation into a high grade lymphoma during its evolution, frequently into a diffuse large B-cell lymphoma clonally related. That is known as Richter's syndrome. A biopsy is needed to diagnose and it may be guided with a PET-CT, with high negative predictive value. Different factors have been associated with the risk of transformation: bulky lymphadenopathy, RAI stage III-IV, unmutated IgHV, some stereotyped B-cell receptors, positive

expression of CD38, ZAP70, CD49d, somatic mutation in CDKN2A and NOTCH1 genes, genetic polymorphisms and CLL treatment. It seems that the lymph node environment favors the transformation. Three different genetic pathways have been described involved in CLL transformation involved in transformation of CLL, and TP53 gen disruptions are the most frequent genetic acquired alteration. The aggressiveness of this disease and its low response to therapy might be associated with polymorphisms.

La leucemia linfática crónica (LLC) es la leucemia más frecuente en occidente, caracterizada por la proliferación de linfocitos B con un fenotipo característico (CD5+ CD23+)⁽¹⁾. Es considerada una neoplasia B de bajo grado, pero los pacientes tienen un riesgo 2 a 5 veces mayor de presentar segundas neoplasias con respecto a la población general, entre los que se incluyen linfoma difuso de células grandes B, linfoma de Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiple y leucemia de células vellosas^(2,3). La mayor supervivencia de los pacientes con diagnóstico de LLC conllevó a mayor incidencia de transformaciones.

En 1928, Maurice Richter describió un cuadro clínico fatal caracterizado por adenopatías generalizadas de rápido crecimiento y hepatoesplenomegalia asociado a la LLC⁽⁴⁾. Años más tarde, se descubrió que dicho cuadro era la transformación en linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) de la LLC y se denominó como síndrome de Richter (SR)⁽⁵⁾.

La clasificación del 2008 de la Organización Mundial de la Salud de tumores hematológicos define como SR a la transformación de la LLC en un linfoma de mayor agresividad⁽⁶⁾. En el 70% de los casos la nueva neoplasia corresponde histológicamente a LDCGB, sin embargo existe una minoría que puede transformarse a linfoma de Hodgkin (15%), leucemia prolinfocítica (15%) y, en casos extraordinarios, a mieloma múltiple o leucemia linfoblástica aguda. Comparando la secuencia del gen de la cadena pesada de inmunoglobulinas (IgVH) de la LLC y del LDCGB asociado, se determinaron dos grupos: por un lado, los relacionados clonalmente (80-90%) y por otro los que no estarían vinculados a la patología de

base (10-20%). En las formas clonales, la aparición de nuevas lesiones moleculares durante la evolución de la LLC se vincularían con la transformación. En el segundo caso, la aparición de un LDCGB estaría vinculada con la disregulación inmune del paciente con LLC y tendría características biológicas y comportamiento similar al LDCGB de novo. Dadas las diferencias entre las formas de presentación del SR, algunos autores sugieren que el término debería restringirse únicamente a la transformación a LDCGB relacionada clonalmente⁽⁷⁾.

Entre un 2 y 10% de los pacientes diagnosticados con LLC sufrirán durante la evolución de su enfermedad transformación a un linfoma de alto grado⁽⁵⁾, en cualquier momento de la evolución de la enfermedad, incluso al diagnóstico⁽⁸⁾. El tiempo promedio reportado entre el diagnóstico de LLC y el SR es entre 1.8 a 5 años^(5,9,10). La mayoría de los casos portan alteraciones genéticas de mal pronóstico y son refractarios al tratamiento, por lo que la supervivencia media es menor a 12 meses, incluso si reciben tratamiento con inmunoterapia o quimioterapia convencional^(5,9,11).

Parecería que los factores de riesgo de transformación son diferentes a los de progresión de la LLC⁽¹⁾. Las características hereditarias de la línea germinal, algunos factores biológicos y genéticos del clon de LLC, características clínicas de la enfermedad y los tratamientos recibidos, han sido implicados en la fisiopatología de la transformación. Esta revisión se enfocará en el LDCGB relacionado clonalmente a la LLC, dado que es la forma de presentación más frecuente y más estudiada.

Manifestaciones clínicas y diagnóstico del síndrome de Richter

El diagnóstico de SR debe sospecharse cuando un paciente ya conocido agrega al cuadro clínico crónico fiebre elevada, aumento rápido del tamaño ganglionar, pérdida de peso, hipercalcemia o aumento de la enzima láctica deshidrogenasa (LDH)⁽¹²⁾. En ocasiones el paciente puede presentar alteraciones en el proteinograma electroforético sérico⁽¹³⁾ o síntomas abdominales secundarios a esplenomegalia progresiva o hepatomegalia. La localización más frecuente suele ser ganglionar, pero las formas extraganglionares no son infrecuentes, entre las que se incluye tracto gastrointestinal, amígdalas, hígado, piel y médula ósea^(11,14). La afectación del sistema nervioso central es excepcional y se manifiesta con síntomas neurológicos abruptos que pueden ser la única manifestación inicial^(15,16). Los principales diagnósticos diferenciales son progresión de la LLC o transformación a otra neoplasia.

El diagnóstico debe realizarse a través de una biopsia y sólo en casos excepcionales, como situaciones clínicas graves o localizaciones de alto riesgo, podría realizarse una punción⁽⁵⁾. En la histología se puede observar infiltración por linfocitos B atípicos grandes, fácilmente diferenciables de los linfocitos característicos de la LLC. Existen dos variantes morfológicas: centroblástica (la más frecuente) e inmunoblástica⁽¹⁷⁾. Las células neoplásicas suelen tener alta expresión de Ki-67⁽¹⁸⁾.

En la mayoría de los casos la célula tumoral presenta fenotipo postgerminal (MUM1+), aunque entre 20-38% puede presentar fenotipo centrogerminal (CD10+ BCL6+). Es frecuente la pérdida de la expresión de CD5 y CD23, sin estar esto relacionado con el vínculo clonal entre la LLC y el LDCGB al que se transformó. La relación clonal puede ser determinada fácilmente en los casos que presentan restricción en cadenas livianas diferentes. Si expresaran la misma cadena, sería necesario el análisis genético con secuenciación del gen de la cadena pesada de inmunoglobulinas. En la mayoría de los centros no se encuentra disponible esta técnica, fundamental para definir dos grupos con pronóstico diferente⁽¹⁷⁾. La tomografía computada con emisión de positrones (PET/TC) podría ser útil para el diagnóstico, estadificación y seguimiento del SR⁽¹⁷⁾.

En un estudio retrospectivo realizado por el grupo del centro de cáncer MD Anderson sobre 332 pa-

cientes, los PET/TC con SUV_{máx} más altos correlacionaron histológicamente con LLC agresiva o SR. El SUV_{máx} mayor o igual a 10 se correlacionó con menor supervivencia global y con una supervivencia media de 6.9 meses. Considerando como punto de corte el SUV mayor o igual a 5, el PET/TC presentó una excelente sensibilidad (91%) y alta tasa de valor predictivo negativo (97%), pero con una especificidad del 80% y un valor predictivo positivo de sólo 53%, motivo por el cual es fundamental la realización de una biopsia ganglionar, ya que sólo la mitad presentarán realmente transformación histológica. Además, en este estudio la punción por aguja fina presentó alta tasa de falsos negativos, reforzando el concepto de que el diagnóstico debe realizarse a través de biopsia. Si bien el estudio no fue diseñado para evaluar respuesta al tratamiento, parecería que aquellos pacientes que presentan mejoría del PET/TC luego del tratamiento podrían tener mayor supervivencia.

La evidencia disponible hoy en día no justifica el uso del PET/TC en forma rutinaria durante el seguimiento de la LLC pero sí ante la sospecha de transformación⁽¹⁹⁾. Dado que la transformación de la LLC suele ocurrir en un sitio puntual nodal o extranodal, hoy en día la principal utilidad del PET/TC radica en determinar el sitio ideal para tomar la biopsia en aquellos pacientes con sospecha de SR.

Finalmente, se debe completar la estadificación acorde a un LDCGB de novo: completar estudios de laboratorio, realizar punción-biopsia de médula ósea, y evaluar comorbilidades para definir el tratamiento quimioterápico. En caso de presentar afectación de senos paranasales, testículos, epidural, médula ósea, de más de dos sitios extranodales o asociación a HIV se debería realizar una punción lumbar con la finalidad de descartar compromiso de sistema nervioso central⁽²⁰⁾.

La supervivencia media de los pacientes con SR es de 8 meses y el tiempo libre de falla de tratamiento es de 7 meses⁽¹²⁾. Aquellos que logran llegar al trasplante alogénico de médula ósea podrían tener una mejor supervivencia.

Se diseñó un puntaje pronóstico para predecir la evolución de pacientes tratados (**Tablas 1 y 2**) que establece 4 grupos con diferentes tasas de supervivencia (**Figura 1**).

Dado el mal pronóstico de los pacientes con riesgo alto, debe considerarse a este grupo como candida-

tos a participar en protocolos de investigación⁽¹²⁾.

Tabla 1. Factores pronósticos independientes de supervivencia global

Factor pronóstico	Riesgo relativo	P
Estado funcional 2, 3 ó 4	2.02	0.006
LDH > 1.5 veces el valor normal	1.82	0.003
Plaquetas < 100000/mm ³	1.69	0.012
Tamaño tumoral > 5 cm	1.61	0.022
Más de 1 tratamiento previo	1.62	0.024

(Adaptado de Tsimberidou y col⁽¹²⁾).

Tabla 2. Puntaje de riesgo

Riesgo	Puntaje	Sobrevida media (años)
Bajo	0-1	1.12
Intermedio bajo	2	0.9
Intermedio alto	3	0.33
Alto	4-5	0.14

(Adaptado de Tsimberidou y col⁽¹²⁾).

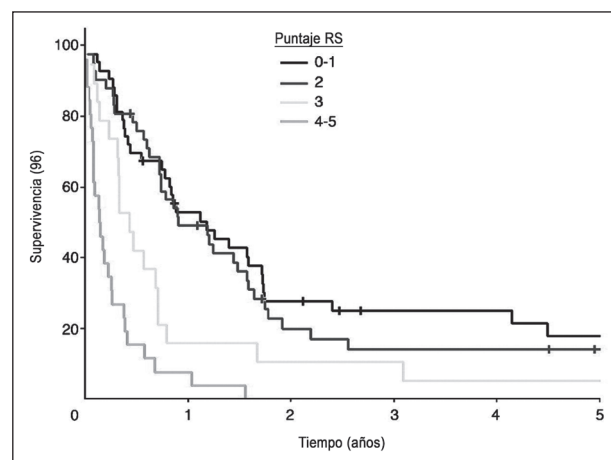


Figura 1. Supervivencia según grupo de riesgo del puntaje de SR (adaptado de Tsimberidou y col⁽¹²⁾).

Factores asociados al riesgo de transformación a síndrome de Richter

I. Factores clínicos sugestivos de transformación

Los únicos factores clínicos independientes de riesgo de transformación a SR identificados son el tamaño ganglionar mayor a 3 cm en el examen físico, con un riesgo relativo de 6.5, y el estadio de RAI avan-

zado (III-IV)⁽⁸⁻¹⁰⁾. Ambos parámetros relacionan el riesgo de transformación con la masa tumoral. La infiltración ganglionar extensa sería un prerrequisito para la transformación, dado que el microambiente sería óptimo para la proliferación y transformación blástica de las células.

Otros datos clínicos relacionados con la enfermedad leucémica, vinculados a su vez al riesgo de progresión de la LLC, como por ejemplo el recuento de glóbulos blancos, no fueron relacionados al riesgo de desarrollo de SR, poniendo de manifiesto que la transformación y la progresión de la LLC son eventos diferentes en la evolución de la LLC.

II. Características biológicas de la célula B con potencial de transformación

Diferentes características de la célula B se vincularon con el riesgo de transformación:

1. Estado mutacional del gen de la cadena pesada de inmunoglobulinas (IgVH)
2. Uso de receptores estereotipados
3. CD38 y ZAP70
4. CD49d
5. Longitud de telómeros.

Estado mutacional del gen de la cadena pesada de inmunoglobulinas (IgVH)

Cuando un linfocito B se activa frente a un antígeno se produce el llamado proceso de hipermutación somática, en el cual se realizan múltiples mutaciones puntuales al azar en las regiones variables de los genes de las cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas. Algunos linfomas se caracterizan por presentar patrones de mutaciones somáticas en el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgVH) típicos de receptores que han sufrido selección antigénica. Es por esto que se postula que el desarrollo de las neoplasias B podría estar influenciado por el reconocimiento y selección antigénica a través del receptor de la célula B (BCR), es decir, que un antígeno podría estar involucrado al estimular la proliferación.

En el caso de la LLC, las mutaciones somáticas del IgVH pueden estar o no presentes, determinando dos grupos: aquellos que presentan una homología mayor o igual al 98% con la línea germinal se consideran “no mutados” (es decir, que no presentan mutaciones somáticas en el gen IgVH), mientras

que si la homología es menor a 98% se considera al clon como "mutado"⁽²¹⁾. Múltiples estudios han vinculado el estado mutacional del IgVH con el pronóstico de la LLC: el gen no mutado se asocia a una enfermedad más agresiva, con menor supervivencia y menos tiempo libre de tratamiento^(22,23).

El estado no mutado del IgVH aumenta el riesgo de transformación, siendo éste el estado más frecuente hallado en pacientes con SR. Sin embargo, existen casos de pacientes mutados que sufrieron transformación clonal^(10,17,24).

Las células de la LLC suelen tener diferente capacidad para la transmisión de señales a través del BCR, siendo más efectiva en los casos que no han sufrido mutación. La evolución favorable de los pacientes con IGVH mutada podría estar relacionada con la baja capacidad de responder a señales de supervivencia y proliferación a través de un BCR desensibilizado⁽²¹⁾.

Uso de receptores estereotipados

La gran variabilidad del reconocimiento antigénico por los linfocitos B depende principalmente de una región de la cadena pesada de inmunoglobulinas conocida como HCDR3 (región hipervariable de la cadena pesada 3). Al producirse la hipermutación somática, la región HCDR3 es una de las principales regiones que expresa cambios conformacionales en el BCR, transformándose en una región crítica al momento de determinar la especificidad del receptor⁽²⁵⁾.

Entre 20 y 30% de los pacientes con LLC presentan alta homología en la región HCDR3 y presentan sitios de unión al antígeno casi idénticos; este fenómeno es conocido como **receptor estereotipado**. Se han establecido más de 200 conjuntos de receptores estereotipados, conocidos como "subsets". El hecho de que diferentes pacientes no relacionados y de diferentes partes del mundo presentan BCR conformacionalmente muy parecidos y que por ende reconocen antígenos con epitopes muy similares, genera la hipótesis de que los clones leucémicos que comparten un determinado receptor estereotipado son seleccionados y estimulados a proliferar por antígenos determinados. La presencia del receptor estereotipado es independiente del estado mutacional del gen IgVH. Por lo tanto, la célula B que origina la LLC habría estado expuesta a un antígeno, sin importar el estado mutacional del IgVH^(21,26-29).

La frecuencia de HCDR3 estereotipado en pacientes con SR es 50%, ligeramente superior a la de los pacientes con LLC, lo que sugiere implícitamente que la estimulación antigénica crónica tenga un rol en la linfomagénesis.

La presencia de receptores estereotipados es un factor de riesgo de SR independiente, aumentando el riesgo de transformación entre tres y cuatro veces^(8,10,30). Además del interés clínico, sustenta la hipótesis del rol antigénico en el desarrollo de SR. Muchos de los "subsets" conocidos de la célula LLC presentan afinidad antigénica por moléculas que exponen las células en apoptosis. Estos "subsets" se vincularían a peor pronóstico de la LLC, como por ejemplo en el caso del "subsets" 8, que presenta fuerte afinidad por la miosina no muscular y la vimentina, entre otros. La presencia de "subsets" 8 aumenta el riesgo de transformación 17 veces, en comparación con ausencia de receptor estereotipado⁽³⁰⁾. También se observó mayor afinidad por diversos antígenos de células apoptóticas en los receptores no mutados, lo que se relacionaría con la peor evolución⁽³¹⁾.

Parece ser que los "subsets" que determinan el riesgo de transformación son diferentes a los del riesgo de progresión. Por ejemplo, el "subsets" 2 (IGHV3-21) es predictor de riesgo de progresión pero no de transformación⁽²¹⁾.

Queda aún por definir qué "subsets" de receptores estereotipados aumentan el riesgo de transformación, y si es que existe una asociación entre éste y las alteraciones genéticas.

ZAP70 y CD38

El CD38 corresponde a una proteína transmembrana de cadena simple, que participa en la recepción de señales antigénicas. Su activación genera aumento del AMP cíclico y, consecuentemente, del calcio intracelular⁽³²⁾. La proteína ZAP70 es una tirosina quinasa miembro de la familia SYK involucrada en la transmisión de señales, que se expresa durante la ontogenia B temprana y en linfocitos B maduros de bazo y amígdala⁽³³⁾. La activación de CD38 genera la fosforilación de ZAP70, por lo que los dos marcadores se encuentran relacionados funcionalmente y, sólo aquellas células que expresen ambos tendrán sobreactivación de la vía CD38. Este hecho explica racionalmente por qué ambos marcadores deben ser evaluados simultáneamente.

En la mayoría de los clones de LLC, la marcación de ambas moléculas es concordante, siendo discordante en el 30%. Aquellos pacientes con ambos marcadores positivos tienen un tiempo libre de tratamiento de 30 meses, mientras que si son negativos es de 130, estableciéndose a la marcación positiva como un factor pronóstico adverso. En los casos discordantes, el tiempo libre de tratamiento es de 43 meses, pero estos pacientes suelen presentar además alteraciones citogenéticas de alto riesgo (como deleciones del brazo corto del cromosoma 17 o del brazo largo del cromosoma 11) que indican una biología diferente⁽³⁴⁾.

Las células CD38+/ZAP70+ tienen mayor habilidad para migrar a los órganos linfáticos donde un microambiente favorable genera señales de supervivencia y proliferación, y eventualmente para la transformación blástica. El nivel de expresión de ambos marcadores se modifica durante la evolución de la LLC según la interacción con el microambiente, favorecido por la interleuquina-2. Las células que se encuentran en los ganglios linfáticos y en médula ósea tienen mayor expresión de CD38 que aquellas que se encuentran en circulación en la san-

gre periférica, las cuales pierden la expresión de este marcador. Por lo tanto, la alta expresión de CD38 se podría correlacionar con alto recambio celular. Se genera así un tráfico de señales entre el microambiente y la célula LLC que podría representar un posible blanco terapéutico⁽³³⁾.

Esta teoría es congruente con el hecho de que el tamaño ganglionar mayor a 3 cm es un factor de riesgo independiente de transformación, indicando que la misma depende, entre otros factores, de que la enfermedad se aloje predominantemente en los ganglios linfáticos^(32,33).

La expresión de CD38 mayor o igual al 30% y la de ZAP70 mayor o igual a 20% fueron establecidas como factores de riesgo de transformación independientes, con un riesgo absoluto de 4.26 y 11.24 respectivamente (**Figura 2**)^(8,10). En un estudio de Rossi y col.⁽⁸⁾, los pacientes que presentaban CD38+ y receptor estereotipado IgHV4-39 fueron los que tuvieron mayor riesgo de transformación, con un riesgo a 5 años de 72.2%. Contrariamente, los pacientes que no presentaron ninguno de los dos parámetros tuvieron el riesgo de transformación más bajo: 5% a 5 años (**Figura 2**).

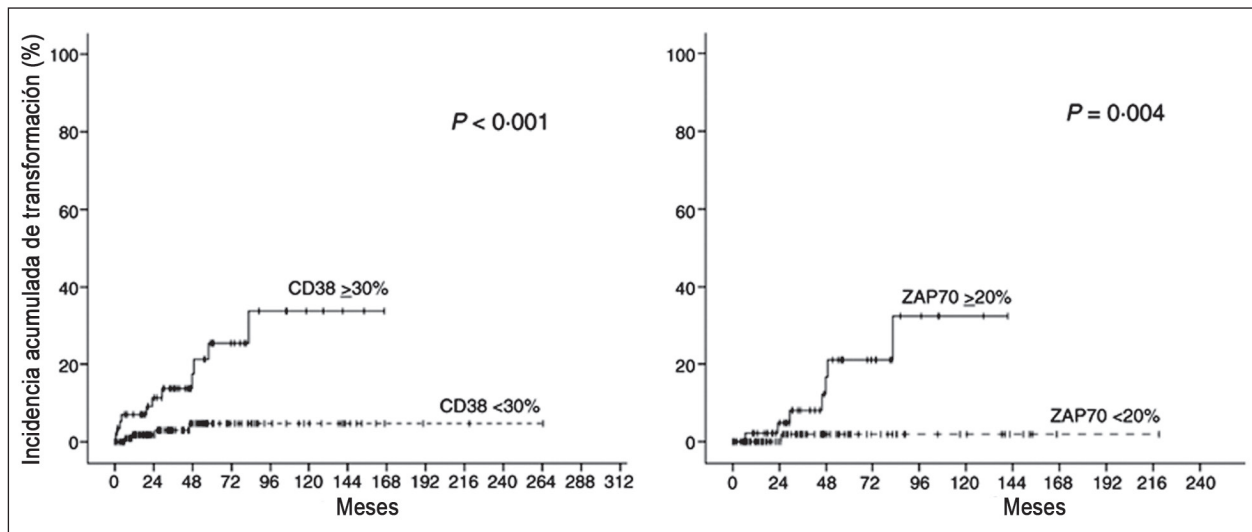


Figura 2. Incidencia de transformación según marcación de CD38 y ZAP70 (adaptado de Rossi y col⁽⁸⁾)

CD49d+

El marcador CD49d corresponde a una integrina que participa del tráfico leucocitario, en la activación del linfocito y su interacción con el medio ambiente favoreciendo su supervivencia. Se considera que es positivo cuando lo expresa más del 30% de las células LLC. Su positividad se suele acompañar de otros factores de mal pronóstico como IGVH

no mutado, ZAP70+ y CD38+. Las células clonales con estas características recibirían señales del estroma que favorecen su supervivencia, migración y resistencia a la apoptosis⁽³⁵⁾.

La expresión de CD49d es un predictor de supervivencia global independiente en pacientes con diagnóstico de LLC, y su mayor expresión correlaciona

con la marcación positiva de ZAP70 y CD38^(34,35). Se lo considera un factor de riesgo de mal pronóstico y progresión, así como un factor de riesgo independiente de SR⁽¹⁰⁾, presente en el 77% de los pacientes que sufren transformación.

Su expresión se ha vinculado a la trisomía 12, ya que son concordantes en aproximadamente 90% de los casos. Por lo tanto, se podría considerar al CD49d como subrogante de dicha alteración citogenética⁽³⁶⁾.

Longitud de los telómeros

Los telómeros son secuencias repetitivas de ADN que se ubican en los extremos de los cromosomas. Aseguran estabilidad genética, regulan funciones del ciclo celular y requieren determinado largo para poder proteger al ADN. Las células neoplásicas tienen telómeros disfuncionales, generalmente cortos, y aumento de la expresión de la telomerasa para intentar corregirlos⁽³⁷⁾.

Utilizando como corte 5000 pares de bases, la longitud telomérica es un predictor independiente de supervivencia global y de tiempo libre de tratamiento de la LLC. Con respecto al riesgo de transformación, la disminución del largo del telomero aumenta 2.7 el riesgo absoluto⁽³⁸⁾, siendo un factor de riesgo independiente de transformación. Sin embargo, actualmente no es un estudio disponible en la práctica.

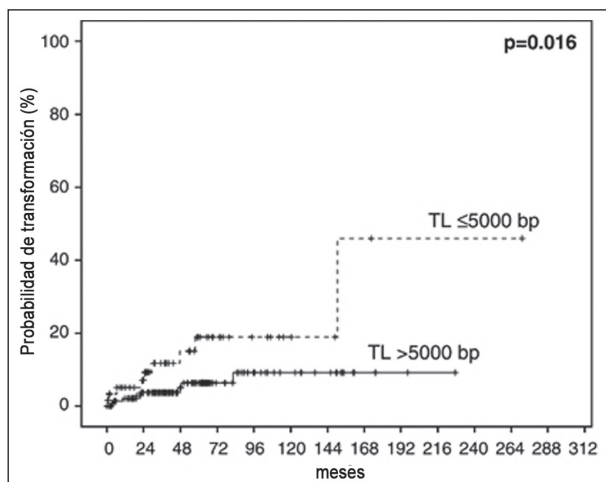


Figura 3. Probabilidad de transformación según largo telomérico. (adaptado de Rossi y col⁽³⁸⁾).

III. Mutaciones somáticas

Se han realizado grandes avances con respecto al estudio de las mutaciones somáticas presentes en el SR. Múltiples grupos de investigación se han enfocado fundamentalmente en determinar cuáles son

las diferencias genéticas con la LLC, qué mutaciones son adquiridas durante la transformación, cuáles podrían ser predictoras de transformación y si existen mecanismos fisiopatológicos compartidos con el LDCGB de novo.

La mutación más frecuente en el SR es la alteración del gen TP53, presente en el 47% de los pacientes, ya sea como del 17p13 o como mutaciones somáticas del gen⁽³⁹⁾. En segundo lugar, le siguen en frecuencia las alteraciones del gen C-MYC en 26%-40% de los casos. Muy frecuentemente, ambas son adquiridas durante la transformación, dado que no se suelen encontrar presentes en las células LLC previamente a la misma.

Las alteraciones del gen TP53 fueron asociadas a mayor número de alteraciones citogenéticas, reflejando la inestabilidad genética que genera su mutación⁽⁴⁰⁾. Además, son predictoras de supervivencia independientes, con una supervivencia media de 9.4 meses vs 47.1 meses en los pacientes que no las presentan ($p < 0,001$) (**Figura 4**)⁽³⁹⁾.

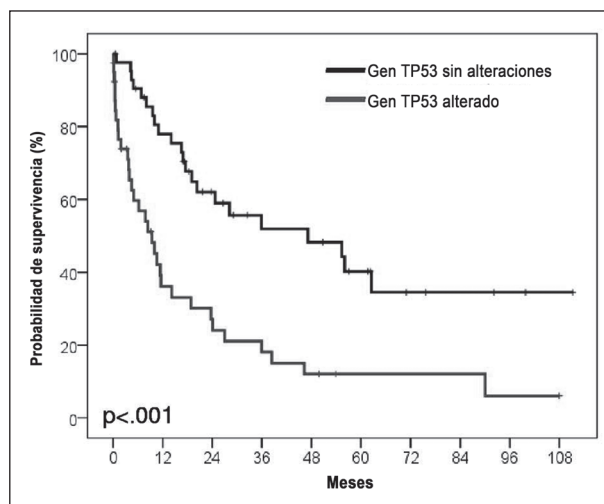


Figura 4. Supervivencia estimada según estado mutacional del gen TP53 (adaptado de Rossi y col⁽³⁹⁾).

La mutación del gen NOTCH1 conlleva la activación constante de la vía MYC y estimula la diferenciación y proliferación celular. Su prevalencia en LLC es cercana al 10%, pero aumenta a 30-40% en el SR^(41,42). Es un factor de riesgo independiente de transformación, aumentando el riesgo a 5 años de 6.8% a 18.3% (**Figura 5**)⁽⁴³⁾. A 15 años, 40% de los pacientes con NOTCH1 mutado se habrán transformado, por lo cual es una importante causa de muerte en este grupo⁽⁴²⁾. Además, se asoció a refractariedad al tratamiento y pobre supervivencia^(41,44).

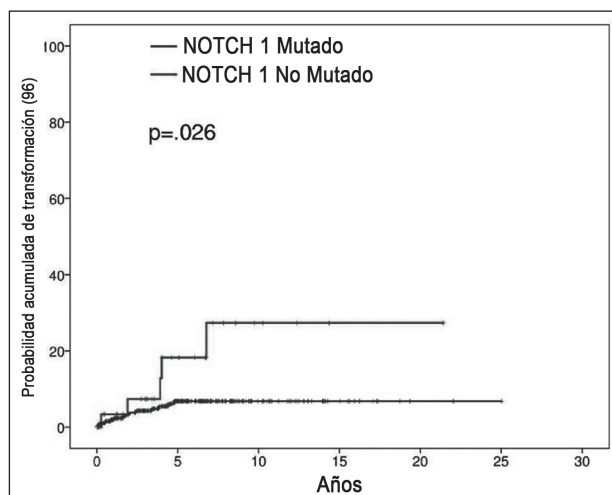


Figura 5. Probabilidad acumulada de transformación según estado mutacional del gen *NOTCH1* (adaptado de Rossi y col⁽⁴³⁾)

La mutación del gen *NOTCH1* suele estar presente en pequeños subclones previo a la transformación. Se observó que aquellos pacientes con LLC que presentan la mutación del *NOTCH1* suelen presentar además estado no mutado del gen *IgVH*, expresión elevada de *CD38* y de *ZAP70* y se suele asociar a trisomía del cromosoma 12 (+12), pero se desconoce aún si existe un vínculo y un mecanismo cooperativo entre estos factores que lleve a la transformación⁽⁴¹⁾. La mayor expresión de integrinas de superficie, favorecida por +12, y la menor expresión de b2-integrina, inducida por la mutación *NOTCH1*, permitirían escapar de la vigilancia inmunológica. Sin embargo, son hallazgos recientes en LLC que no han sido estudiados en SR⁽⁴⁵⁾.

Se descartó que las mutaciones del gen *SF3B1* o que afecten 14q32 (involucrando *IgVH*), ambas marcadoras de mal pronóstico de LLC, aumenten el riesgo de transformación a SR^(42,46).

La mayoría de las aberraciones genéticas presentes en el SR son adquiridas durante la transformación, en especial la del9p21, afectando el gen *CDKN2A*, un gen supresor de tumores. Su inactivación por pérdidas genéticas se presentó con similar frecuencia en el SR y en el LDCGB de novo (principalmente fenotipo célula B activada), en ambas patologías vinculado a mal pronóstico.

La del17p13.1, la del8p, la add2p y la ausencia de del13q14.3 demostraron ser factores de riesgo independientes de transformación a SR, al encontrarse más frecuentemente en pacientes que sufrieron

transformación a SR en 6 años de seguimiento. Los pacientes con diagnóstico de LLC que presentan únicamente del13q14.3 tendrían mayor estabilidad genética con bajo riesgo de adquirir nuevas mutaciones y, por ende, bajo riesgo de progresión y transformación, con una supervivencia ligeramente inferior a la de la población de igual sexo y edad⁽⁴⁷⁾. Fueron determinados tres grupos de alteraciones genéticas que pueden estar presentes en pacientes con SR:

1. inactivación del *TP53* y/o pérdida del *CDKN2A* con la activación del *MYC* y del13q14.3 (50%);
2. +12 asociada a mutaciones del gen *NOTCH1* (30%);
3. diferentes alteraciones genéticas (20%).

Establecen así tres vías genéticas diferentes y excluyentes una de otra, relacionadas con el desarrollo del SR. La primera, la más frecuente, acumula lesiones genéticas que llevan a la inactivación del *P53*, activación del *MYC* y pérdida del *CDKN2A*. Este grupo se caracteriza por índice de proliferación alto ($Ki67 > 70$) y peor supervivencia. El segundo mecanismo ocurre en un tercio de los pacientes y comienza con la adquisición de la trisomía del cromosoma 12, seguido de mutaciones somáticas del gen *NOTCH1*. Finalmente, un tercer grupo en el que la transformación no se explicaría por ninguna de las dos vías descritas, y presentan un patrón heterogéneo de alteraciones genéticas. Por secuenciación genómica⁽⁴⁷⁾ se obtuvieron resultados similares, frecuentemente coexistencia de la delección del gen *CDKN2A* con alteraciones del *TP53* y con activación del gen *MYC*, a su vez excluyentes con la +12. (Figura 6)

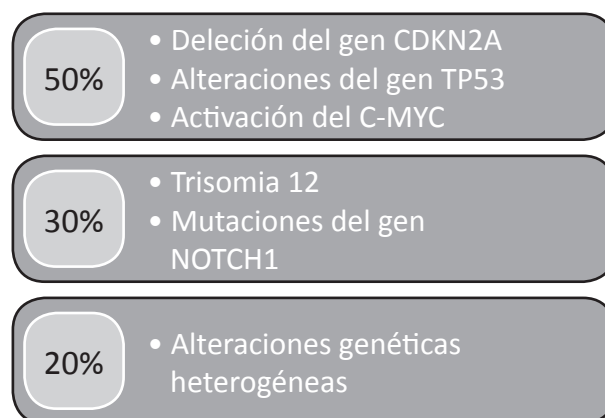


Figura 6. Alteraciones genéticas asociadas con el SR

En la mayoría de las muestras de SR las alteraciones detectadas en fase LLC se encuentran presentes, y además adquieren un número variable de alteraciones genéticas. Probablemente exista una evolución lineal al agregar nuevas mutaciones a las que ya se encontraban presentes en la fase LLC, provocando un cambio clinicopatológico y la consecuente modificación del curso de la enfermedad. Existe un fenotipo raro del SR, con una fase leucémica muy agresiva, que se originaría a partir de un subclón precursor seleccionado, probablemente por regímenes terapéuticos⁽⁴⁰⁾.

La complejidad genética de la LLC es menor a la del SR, el cual a su vez es menos complejo que el LDCGB de novo. Esto sugiere que, por ejemplo, alteraciones epigenéticas o mutaciones no conocidas podrían estar vinculadas con el peor pronóstico del SR en comparación con los linfomas de novo⁽⁴⁸⁾.

Los cambios epigenéticos en el SR serían eventos tempranos que se acumulan progresivamente y probablemente contribuyan con el proceso de transformación. Si bien el patrón de metilación del SR es similar al de la fase LLC, hay diferencias marcadas en determinados genes, como el DC, el CDKN2A, el WT1, el OMS y el S1PR4, que son hipermetilados luego de la transformación⁽⁴⁹⁾.

En resumen, las alteraciones genéticas más frecuentes del SR son deleciones, especialmente la del17p, establecida como la mutación más frecuente. Los genes más frecuentemente mutados son los genes TP53, NOTCH1, MYC y CDKN2A⁽⁴⁰⁾. Las alteraciones genéticas y moleculares que demostraron ser factores de riesgo de transformación son la del17p13.1, del8p, add2p, ausencia de del13q14.3 y mutación del gen NOTCH1. La mayoría de las alteraciones son adquiridas durante la transformación, excepto la del17p que, si bien muchos pacientes la adquieren durante la misma, puede estar presente en el clon de LLC. La transformación es un proceso lineal basado en adquirir nuevas mutaciones que llevan al cambio clinicopatológico de la célula, excepto en las formas leucémicas que surgirían a partir de un subclón seleccionado. Como fue descrito, se han establecido tres vías de transformación excluyentes entre sí. Finalmente, los eventos genéticos y el patrón de metilación del LDCGB de novo son diferentes a los del SR.

IV. Polimorfismos genéticos

Se han estudiado e identificado múltiples polimorfismos de nucleótidos simples (PNSs) que pueden modificar el curso de la enfermedad⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. Si bien el rol de éstos en la fisiopatología del SR aún no está claramente establecido, los PNSs de los genes BCL2, CD38 y LRP4 son los más estudiados.

El gen CD38, ubicado en el brazo corto del cromosoma 4, puede presentar variación de citosina por guanina en la posición 184 (184C>G) en el intrón 1. El alelo G (tanto GC como GG) se asoció a mayor masa tumoral. Aydin y col⁽⁵³⁾ demostraron que los pacientes que sufrían transformación tenían mayor frecuencia de alelo G, más aún en forma homocigota. La incidencia acumulada de SR a 5 años fue significativamente mayor para los pacientes con alelo G en comparación con homocigotas CC (14.2% vs 5.2%) (**Figura 7**). Por lo tanto, la presencia de guanina en la posición 184 en el intrón 1 del gen CD38 es un factor de riesgo de transformación.

El gen LRP4 codifica una lipoproteína encargada de inhibir la vía Wnt. El PNS con genotipo TT generaría una proteína con plegamiento anómalo que causa la desregulación de la vía Wnt. Esta variante se asoció a un aumento del riesgo de transformación de 4.17 veces, y con un riesgo a 5 años de 13.5%⁽⁵⁴⁾. Por otro lado, al analizar 15 pacientes con SR, Parikh y col⁽⁵⁵⁾ identificaron que el PNS del gen BCL2 con genotipo GG aumentaría el riesgo de transformación 3.9 veces.

Los PNSs de los genes CD38, LRP4 y BCL2 son posibles factores de riesgo independientes de transformación; sin embargo, los resultados de los diferentes estudios no son congruentes. Podemos suponer que los polimorfismos germinales tienen un rol en la patogénesis del SR, pero aún faltan estudios reproducibles que determinen cuáles de ellos tienen verdadera importancia.

V. Tratamiento previo de la LLC

Los tratamientos actuales de la LLC combinan análogos de las purinas y anticuerpos monoclonales, los cuales son altamente inmunosupresores, pudiendo aumentar el riesgo de desarrollo de enfermedades linfoproliferativas. Por lo tanto, se ha cuestionado si el tratamiento de la LLC podría ser un factor de riesgo para desarrollar SR.

No se demostró asociación entre el riesgo de transformación y el tratamiento con fludarabina sola,

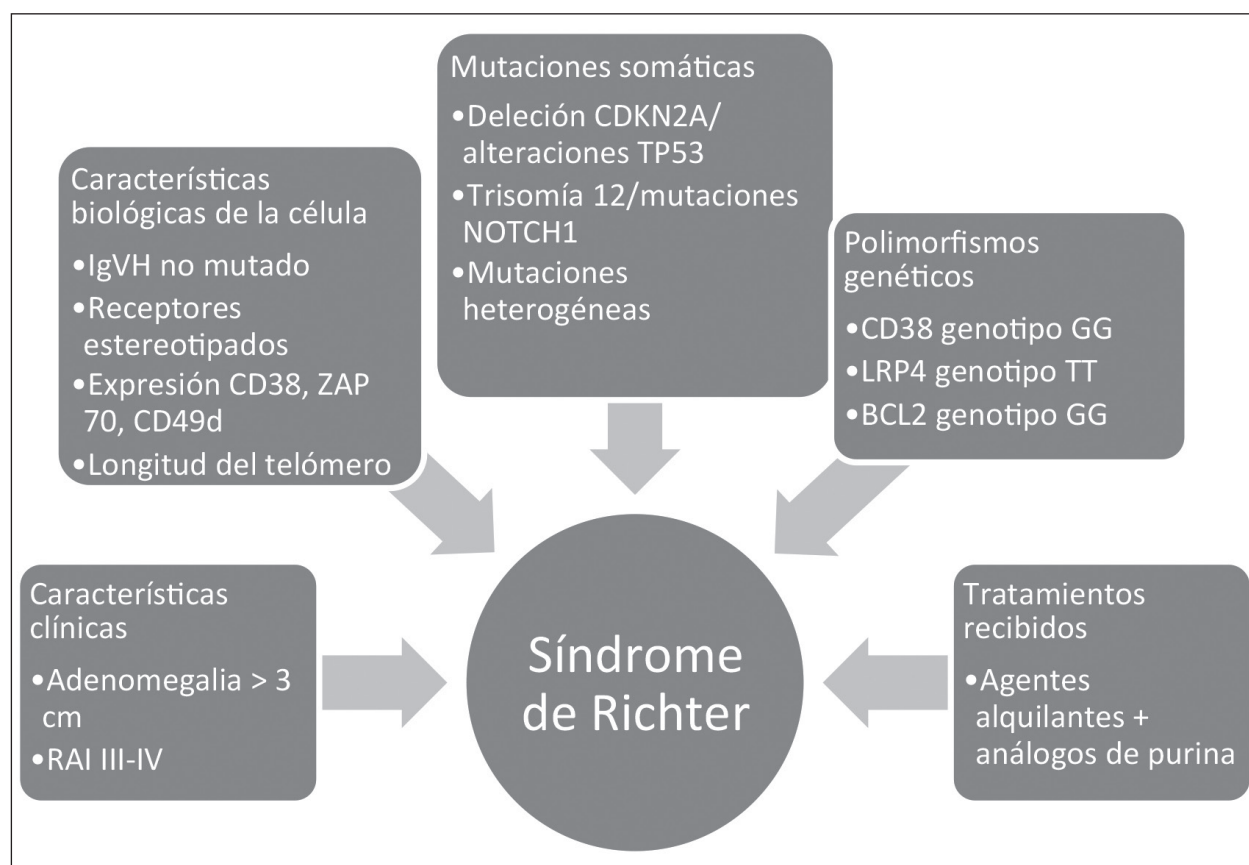
clorambucilo solo ni la combinación de ambos⁽⁵⁶⁾, rituximab asociado a fludarabina⁽⁵⁷⁾ ni la asociación de rituximab a fludarabina y ciclofosfamida⁽⁵⁸⁾ al analizar la evolución de los grupos tratados. Sin embargo, éstos son resultados del seguimiento a largo plazo de pacientes que requirieron tratamiento, y no es posible diferenciar las características biológicas agresivas propias de la célula del impacto de la quimioterapia sobre la transformación. Es por eso que Parikh y col(10) analizaron las características biológicas de pacientes sin tratamiento y realizaron su seguimiento. Sólo 35% requirió tratamiento luego de 4 años. De los pacientes que sufrieron transformación, 54% habían recibido tratamiento previamente, es decir que casi la mitad se transformó a SR sin exposición a quimioterapia. Ambos grupos con marcadores biológicos similares, a excepción de la sobreexpresión de ZAP70, más frecuente en los pacientes tratados. Según los resultados de este estudio, sólo el tratamiento combinado de análogos de purina y agentes alquilantes podría aumentar 3.26 veces el riesgo de transformación ($p=0.0003$), no así el uso de éstos como monoterapia.

Con respecto a las nuevas drogas que surgieron recientemente para el tratamiento de la LLC, como el inhibidor de la tirosina kinasa Bruton ibrutinib, no hay resultados de estudios aún que evalúen el rol de éstas en la fisiopatología del SR. Las transformaciones reportadas fueron en el contexto de estudios citogenéticos de alto riesgo o dentro del año del tratamiento, sugiriendo una enfermedad rápidamente progresiva^(57,59).

Por lo tanto, todavía se desconoce el verdadero impacto del tratamiento clásico de la LLC sobre el riesgo de desarrollar SR y son necesarios estudios diseñados para establecer el riesgo de transformación de las nuevas drogas con mayor número de pacientes.

Conclusión

La transformación de LLC a LDCGB es un proceso complejo que implica el cambio en la evolución de una enfermedad crónica a una enfermedad agresiva de muy mal pronóstico. Se ha logrado una comprensión más profunda durante los últimos años respecto a los mecanismos biológicos y genéticos, resumidos en la siguiente figura:



(Adaptada de Parikh y col⁽⁶⁾)

El riesgo de transformación ha sido vinculado claramente con factores clínicos, biológicos y con mutaciones somáticas. Es controvertido cuál es el rol de los polimorfismos genéticos y de los tratamientos quimioterápicos recibidos previamente, se aguardan nuevos estudios diseñados con el objetivo de establecer el riesgo que existe entre éstos y la transformación, así como también para determinar cuáles tienen un rol directo o si únicamente son marcadores de riesgo de sufrir mutaciones genéticas. Pareciera que existe una relación directa entre los distintos factores biológicos que llevan a la célula tumoral a hospedarse en los ganglios linfáticos generando interacción con el microambiente y la transformación celular. Se desconoce aún cuál es el mecanismo exacto que hace que la célula clonal adquiera mutaciones que llevan a la transformación en vez de a la progresión.

El comportamiento de la enfermedad y las características biológicas y genéticas diferencian la transformación a LDCGB relacionada clonalmente de la no relacionada y de las distintas formas de evolución de la LLC; por lo tanto, el término síndrome de Richter debería utilizarse únicamente para la transformación a LDCGB relacionada clonalmente con la LLC.

La heterogenicidad genómica del SR es muy compleja, pero actualmente se conocen genes que parecieran ser fundamentales en su fisiopatología, como el CDKN2A, el TP53 y el NOTCH1, que surgen como potenciales blancos terapéuticos que podrían modificar el pronóstico de la enfermedad.

Declaración de conflictos de interés:

La autora declara que no posee conflictos de interés.

Bibliografía

- Hoffman R, Benz J, Shattil S et al. Hematology: Basic Principles and Practice, 5th ed. 2008 (1344-1345).
- Maddocks-Christianson K, Slager S, Zent CS et al. Risk factors for development of a second lymphoid malignancy in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2007 Nov;139(3):398-404.
- Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol.* 2013 Sep;88(9):803-16.
- Richter M. Generalized reticular cell sarcoma of lymph nodes associated with lymphatic leukemia. *American J Pathol.* 1928;4(4):285-292.
- Parikh S, Kay N, Shanafelt T. How we treat Richter Syndrome. *Blood.* Mar 2014, 123(11):1647-1657.
- Swerdlow S, Campo E, Harris N et al. WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2008.
- Rossi D, Spina V, Forconi F et al. Molecular history of Richter Syndrome: origin from a cell already present at the time of CLL diagnosis. *Int J Cancer.* 2012 Jun 15;130(12):3006-10.
- Rossi D, Cerri M, Capello D et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol.* 2008 Jun;142(2):202-15.
- Parikh SA, Shanafelt TD. Risk factors for Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2014 Sep;9(3):294-9.
- Parikh SA, Rabe KG, Call TG et al. Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort of newly diagnosed patients. *Br J Haematol.* 2013 Sep;162(6):774-82.
- Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: Molecular insights and clinical perspectives. *Hematol Oncol.* 2009 Mar;27(1):1-10.
- Tsimberidou AM, O'Brien S, Khouri I, et al. Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stemcell transplantation. *J Clin Oncol.* 2006 May 20;24(15):2343-51.
- Robertson LE, Pugh W, O'Brien S et al. Richter's syndrome: a report on 39 patients. *J Clin Oncol.* 1993;11:1985-1989.
- Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: Biology, incidence and therapeutic strategies. *Cancer.* 2005 Jan 15;103(2):216-28.
- Resende LS, Bacchi CE, Resende LA et al. Isolated Richter syndrome in central nervous

- system: a case report. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005 Jun;63(2B):530-1.
16. Robak T, Góra-Tybor J, Tybor K et al. Richter's Syndrome in the Brain First Manifested as an Ischaemic Stroke. *Leukemia & Lymphoma.* 2004, 45 (6):1261-67.
 17. Mao Z, Quintanilla-Martinez L, Raffeld M et al. IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation. *Am J Surg Pathol.* 2007 Oct;31(10):1605-14.
 18. Cordone I, Matutes E, Catovsky D. Monoclonal antibody Ki-67 identifies B and T cells in cycle in chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease activity. *Leukemia.* 1992 Sep;6(9):902-6.
 19. Molica S. FDG/PET in CLL today. *Blood.* 2014 May 1;123(18):2749-50.
 20. NCCN Clinical Guidelines in Oncology: Non-Hodgkin's Lymphomas. Versión 5; 2014.
 21. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood.* 2007 Jan 1;109(1):259-70.
 22. 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 Sep 15;94(6):1840-7.
 23. 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.
 24. Timár B, Fülöp Z, Csernus B et al. Relationship between the mutational status of VH genes and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma in Richter's syndrome. *Leukemia.* 2004 Feb;18(2):326-30.
 25. Regueiro Gonzalez JR, Lopez Larrea C, Gonzalez Rodriguez S y otros. *Inmunología: biología y patología del sistema inmunitario.* 4º edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid; 2010.
 26. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood.* 2012 May 10;119(19):4467-75.
 27. Maura F, Cutrona G, Fabris S et al. Relevance of stereotyped B-Cell receptors in the context of the molecular, cytogenetic and clinical features of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One.* 2011;6(8).
 28. Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F et al. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia.* 2010 Jan;24(1):125-32.
 29. Sutton LA, Kostareli E, Hadzidimitriou A et al. Extensive intraclonal diversification in a subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with stereotyped IGHV4-34 receptors: implications for ongoing interactions with antigen. *Blood.* 2009 Nov 12;114(20):4460-8.
 30. Rossi D, Spina V, Cerri M et al. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 1;15(13):4415-22.
 31. Chu CC, CATERA R, Zhang L et al. Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: implications for patient outcome and cell of origin. *Blood.* 2010 May 13;115(19):3907-15.
 32. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S et al. In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenic network underlying chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006 Aug 15;108(4):1135-44.
 33. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood.* 2007 Dec 1;110(12):4012-21.
 34. Schroers R, Griesinger F, Trümper L et al. Combined analysis of ZAP70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2005 May;19(5):750-8.
 35. Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND et al.

- CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol.* 2008 Mar;140(5):537-46.
36. Zucchetto A, Caldana C, Benedetti D et al. CD49d is overexpressed by trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cell: evidence for a methylation-dependent regulation mechanism. *Blood.* 2013 Nov 7;122(19):3317-21.
 37. Lansdorp PM. Telomeres, stem cells and hematology. *Blood.* 2008 Feb 15;111(4):1759-66.
 38. Rossi D, Lobetti Bodoni C, Genuardi E, Monitillo L et al. Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2009 Jun;23(6):1062-72.
 39. Rossi D, Spina V, Deambrogi C et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood.* Mar 2011;117(12):3391-3401.
 40. Fabbri G, Khiabani H, Holmes A et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter Syndrome. *J Exp Med.* 2013 Oct 21;210(11):2273-88.
 41. 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 Apr;27(5):1100-6.
 42. Rossi D, Rasi S, Spina V, Fangazio M et al. Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol.* 2012 Aug;158(3):426-9.
 43. Rossi D, Rasi S, Fabbri G. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012 Jan 12;119(2):521-9.
 44. Fabbri G, Rasi S, Rossi D et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of Notch1 mutational activation. *J Exp Med.* 2011 Jul 4;208(7):1389-401.
 45. Riches JC, O'Donovan CJ, Kingdon SJ. Trisomy 12 Chronic Lymphocytic Leukemia cells exhibit up-regulation of integrin signaling that is modulated by NOTCH1 mutations. *Blood.* 2014 Jun 26;123(26):4101-10.
 46. Deambrogi C, Cresta S, Cerri M et al. 14q32 Translocations and risk of Richter syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol.* 2009 Jan;144(1):131-3.
 47. Rossi D, Rasi S, Spina V et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2013 Feb 21;121(8):1403-12.
 48. Chigrinova E, Rinaldi A, Kwee I et al. Two main genetics pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood.* Oct 2013;122(15):2673-2682.
 49. Rinaldi A, Mensah A, Kwee I et al. Promoter methylation patterns in Richter syndrome affect stem-cell maintenance and cell cycle regulation and differ from de novo large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2013 Oct;163(2):194-204.
 50. Sellick GS, Wade R, Richards S et al. Scan of 977 nonsynonymous SNPs in CLL4 trial patients for the identification of genetic variants influencing prognosis. *Blood.* 2008 Feb 1;111(3):1625-33.
 51. Rasi S, Forconi F, Brusca A et al. Impact of the host genetic background on prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2010 Feb 4;115(5):1106-7.
 52. Rossi D, Rasi S, Capello D et al. Prognostic assessment of BCL2-938C>A polymorphism in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2008 Jan 1;111(1):466-8.
 53. Aydin S, Rossi D, Bergui L et al. CD38 gene polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: a role in transformation to Richter syndrome? *Blood.* 2008 Jun 15;111(12):5646-53.
 54. Rasi S, Spina V, Brusca A et al. A variant of the LRP4 gene affects the risk of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol.* 2011 Feb;152(3):284-94.

55. Slager S, Rabe K, Kay N et al. Heritable predisposition to Richter syndrome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013, 122 (21) 2867.
56. Solh M, Rai KR, Peterson BL et al. The impact of initial fludarabine therapy in transformation to Richter syndrome or prolymphocytic leukemia in patients with chronic lymphocytic leukemia: analysis of an intergroup trial (CALGB 9011). *Leuk Lymphoma*. 2013 Feb;54(2):252-4.
57. Woyach JA, Ruppert AS, Heerema NA et al. Chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab produces extended overall survival and progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia: Long-term follow up of CALGB study 9712. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1349-55.
58. Fischer K, Bahlo J, Fink A et al. Extended Follow up of the CLL8 Protocol, a Randomized Phase-III Trial of the German CLL Study Group (GCLLSG) Comparing Fludarabine and Cyclophosphamide (FC) to FC Plus Rituximab (FCR) for Previously Untreated Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results On Survival, Progression-Free Survival, Delayed Neutropenias and Secondary Malignancies Confirm Superiority of the FCR Regimen. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2012 120: 435.
59. Woyach JA, Ruppert A, Lozanski G et al. Association of disease progression on ibrutinib therapy with the acquisition of resistance mutations: A single-center experience of 267 patients. *J Clin Oncol* (Meeting Abstracts). May 201