

Factores pronósticos en la leucemia linfocítica crónica y su impacto clínico

Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia and clinical impact

Gabús R

*Servicio de Hematología y Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos.
Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay*

gabusraul@gmail.com



LEUCEMIA
LINFÁTICA CRÓNICA:
DESDE EL
CONOCIMIENTO
MOLECULAR
A LA VIDA REAL

HEMATOLOGÍA
Volumen • 20
Número Extraordinario: 128 - 139
I Jornada Latinoamericana de la SAH:
Agosto 2016

Palabras clave: LLC,
biomarcadores,
pronóstico.

Keywords: CLL,
biomarkers,
prognostic.

El avance en el conocimiento biológico de la leucemia linfocítica crónica (LLC) ha aportado una perspectiva diferente en relación a sus dos poblaciones celulares bien identificadas y diferenciadas que marcan el ritmo evolutivo de la enfermedad.

A su vez explica la gran variabilidad clínica evolutiva de la enfermedad correlacionándolo con las dos formas de LLC, aquella de evolución crónica indolente y lentamente progresiva versus la forma evolutiva agresiva y proliferativa.

Estas dos formas evolutivas responden a una población celular de lenta acumulación contra otro contingente celular de mayor proliferación.

La primera está marcada entonces por un curso evolutivo indolente con alto porcentaje de pacientes en

estadios clínicos tempranos Rai (0-2) - Binet (A-B no evolutivo) en donde un alto porcentaje de ellos no requerirán tratamiento en ningún momento de su enfermedad o si lo hacen lo harán tardíamente.

La segunda relacionada al contingente celular de “proliferación” marca una enfermedad de curso progresor, más agresivo, con alto requerimiento terapéutico y que se identifica más en los estadios clínicos avanzados de Rai y/o Binet.

Sabemos que los estadios clínicos por si solos no nos permiten predecir cuándo el paciente va a evolucionar, cuándo requerirá tratamiento o qué tipo de respuesta tendrá al tratamiento instituido.

Son los **marcadores biológicos o biomarcadores** los que han aportado elementos de identificación que

nos permiten acercarnos más a estos interrogantes. En este sentido podemos definir dos tipos de marcadores biológicos como⁽¹⁾:

- Marcadores biológicos de tipo “pronosticador”. Proveen información probable de la evolución de la enfermedad en ausencia de tratamiento. Proveen también información de la probable evolución independientemente del tratamiento recibido.

Estos factores ayudarán para:

- * informar al paciente de sus posibilidades evolutivas.
- * pautar las frecuencias de los controles.
- * identificar aquellos pacientes apropiados para ensayos clínicos intervencionistas tempranos.
- Marcadores biológicos de tipo “predicador”.

Proveen información sobre el probable beneficio de un tratamiento específico.

Pautan tratamientos: FC/FCR/BR/Clb/Ibrutinib/Venetoclax/Idelalisib.

El efecto terapéutico será diferente si el marcador es positivo a si el marcador es negativo.

Los marcadores biológicos “predicadores” son fundamentalmente los que están relacionados con el perfil mutacional de la IgVH y las alteraciones citogenéticas y biomoleculares.

La heterogeneidad genética de la LLC es una clara clave a la variabilidad clínica pero no es suficiente para explicarla en su totalidad.

Perfil mutacional de las IgVH.

El 50% de los pacientes presentan en las células leucémicas hipermutaciones somáticas en el rearrreglo de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgVH) (Schroeder and Di-

ghiero)⁽²⁾. El análisis de las inmunoglobulinas provee elementos para entender el origen y el comportamiento de las células B malignas de la LLC. Las células *naïve* LLC CD 5+ con IgVH no mutadas son aquellas que no han sufrido exposición antigénica en el centro germinal. En él se produce el cambio de Ig y la hipermutación somática generando un linfocito maduro CLL CD5 mutado que contemplará las características de linfocito CD 5+ memoria con una enfermedad fundamentalmente indolente de curso crónico lentamente evolutivo. Por el contrario, los genes IgVH no mutados están asociados con una LLC de evolución más agresiva y progresora. Los estudios proveen evidencias que la LLC no mutada deriva de linfocitos B CD5(+) *naïve* no mutados y la LLC mutada deriva de linfocitos B CD5(+) post foliculares^(3,4,5,6).

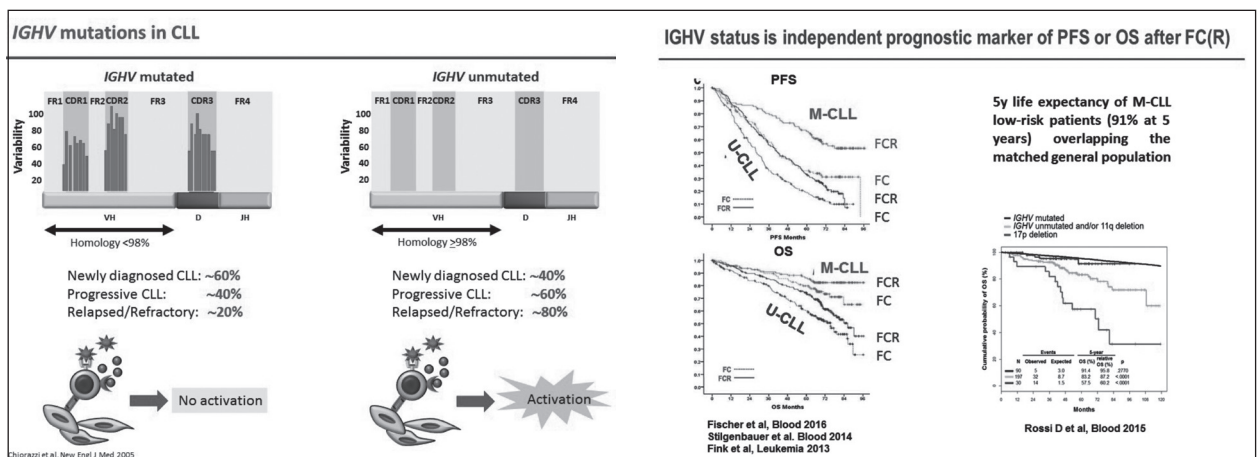
La definición de mutado y no mutado está basado en un nivel definido arbitrariamente con un punto de corte del 98% de identidad con el gen de la línea germinal.

El paso previo y posterior a la exposición antigénica en el centro germinal del ganglio linfático y/o bazo está confirmado por GEP análisis.

El perfil mutacional de las IGVH muestra un perfil mutado en el 60% al momento del diagnóstico y un 40 % frente a la progresión de la enfermedad.

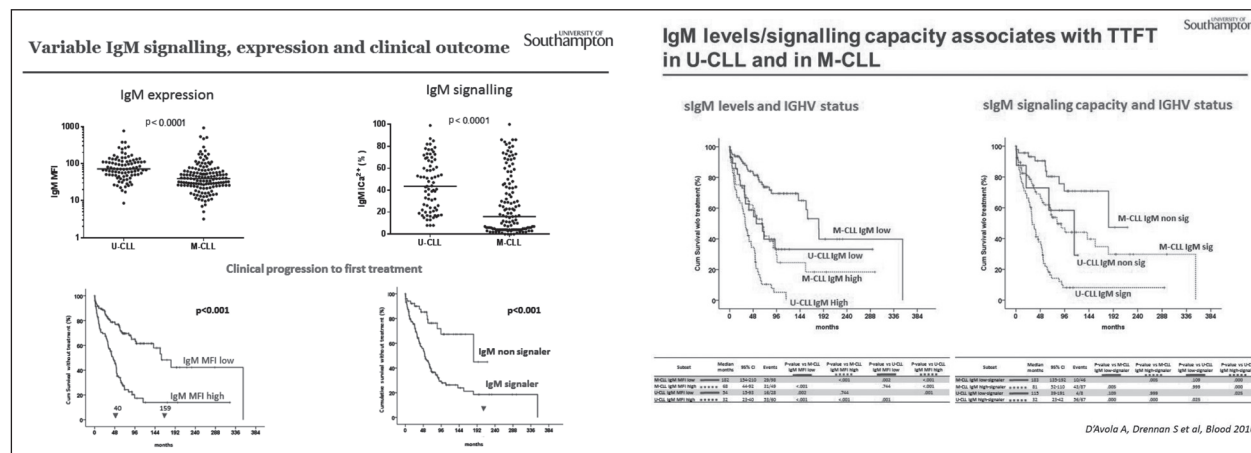
Este porcentaje se encuentra invertido en las LLC en etapas de recaída-refractaria mostrando aproximadamente un 80 % de perfil de IgVH no mutado⁽⁷⁾.

El estado mutacional de las inmunoglobulinas es un marcador pronóstico independiente de la sobrevida libre de enfermedad y de la sobrevida global luego del tratamiento con FC(R). La mejor opción terapéutica para la LLC mutada va a ser la inmunomioterapia de tipo FC(R)⁽⁸⁾.



Distintos factores influyen en la señalización de la IgM en la LLC, como la estimulación antigénica crónica, el microambiente de las células T (IL4), el daño genético, la epigenética, entre otros⁽⁹⁾. Los trabajos de D'Avola y col. han demostrado que

el nivel de expresión de la IgM y su nivel alto de señalización es un predictor de progresión independiente, de la misma forma que la delección 17p o mutación p53/notch1⁽¹⁰⁾.



Resumiendo estos conceptos podemos decir que:

- * el análisis del receptor de linfocito BCR es clave para entender la patogénesis de la LLC y para entender la evolución clínica de la misma: mutado vs no mutado, IgM de señalización vs de no señalización.
- * La capacidad de señalización de la figura anérgica del BCR es variable en la LLC y resulta de la influencia de la estimulación antigénica crónica, genética y epigenética. La consecuencia de una señalización positiva es más la presentación agresiva de la enfermedad mientras que la mayor anergia se asocia con una enfermedad más indolente.
- * La calidad de respuesta a los inhibidores de quinasas, es inferior en la LLC mutada y la terapia convencional FCR es suficiente para obtener respuestas prolongadas. Esto sugiere que el análisis del perfil mutacional de la IgVH BCR puede ser útil para seleccionar el tratamiento en la LLC. En estos casos para algunos autores, las evidencias serían suficientes para recomendar la realización de FISH y de las IgVH en la práctica clínica no sólo al inicio de la terapéutica sino ya al comienzo de la enfermedad pues serían biomarcadores “predictores” de la respuesta terapéutica de la enfermedad⁽¹¹⁾.

Alteraciones citogenéticas.

Si bien ninguna alteración citogenética es propia de la enfermedad, la detección de las mismas juega un papel pronóstico preponderante. En etapas tempranas del clon leucémico las alteraciones citogenéticas

son raras, pero éstas aparecen en el transcurso de la enfermedad y prevalecen en aquellos pacientes de alto riesgo como en los refractarios al tratamiento convencional. Con técnica de hibridación in situ (FISH) con sondas locus específicos, éstas alcanzan a más del 80% de los casos.

Las alteraciones más frecuentes son:

- 1) La delección del cromosoma 13 (13q14) que se ve en el 54% de los casos relacionada con un mejor pronóstico. En estudios recientes se propone la existencia de dos microRNA (mirRNA) (mir-15a y mir-16-1) localizados en 13q14 que estarían involucrados en dicha delección⁽¹²⁾.
- 2) La delección del cromosoma 11q (11q23) en el 19% de los casos
- 3) La trisomía del cromosoma 12 en el 15%
- 4) La delección del cromosoma 17 (17p) en el 7% de los pacientes al comienzo, son las vinculadas con pronóstico más desfavorable⁽¹³⁾.

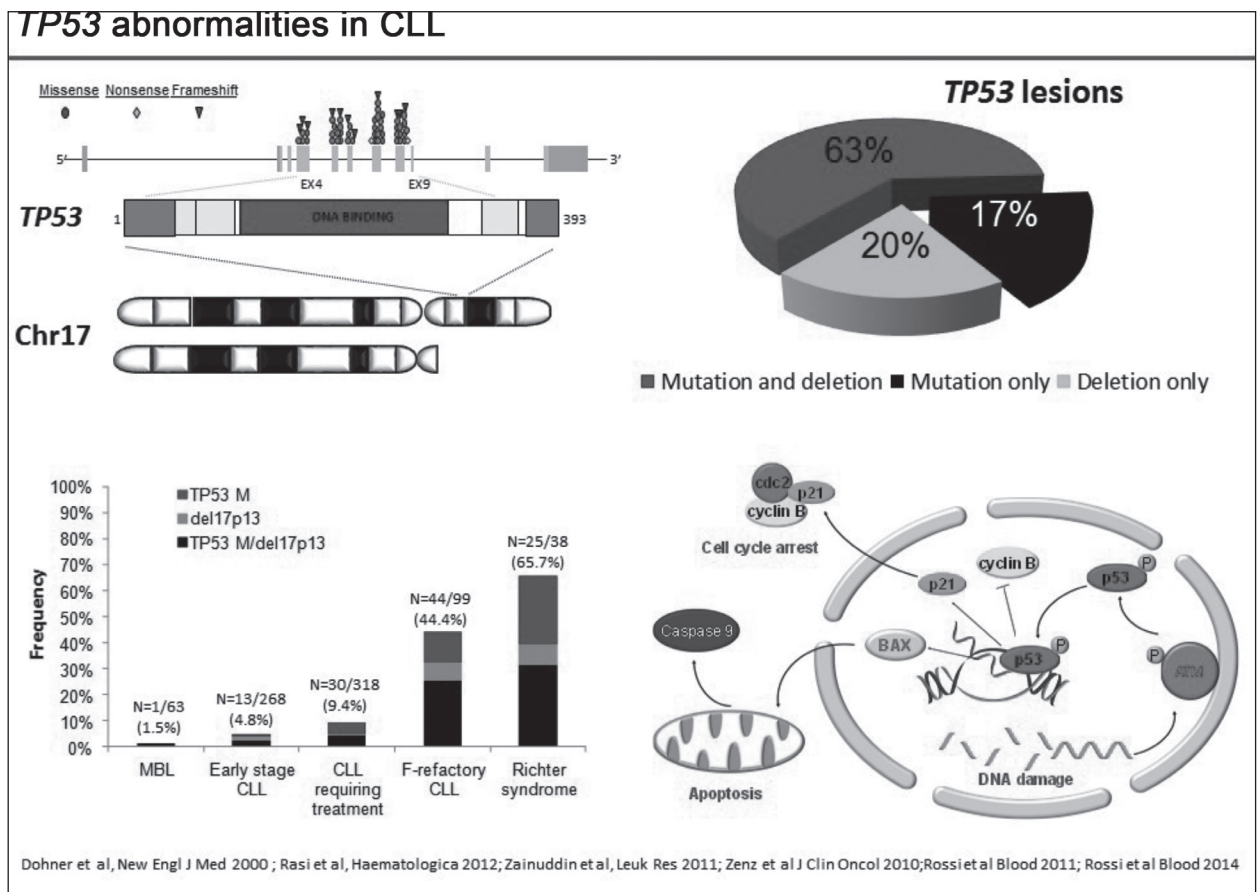
En la banda 17p13 se encuentra codificado el gen supresor tumoral TP53. La mutación de este gen muestra marcada resistencia a la quimioterapia, sin mejoría con la adición de antiCD20. Se asocian con un pronóstico pobre y son considerados los de muy alto riesgo evolutivo.

Estas alteraciones pueden expresarse mayoritariamente bajo ambas formas de delección 17p y mutación p53, pero pueden evidenciarse sólo por separado como lo muestra la tabla adjunta⁽¹⁴⁾.

Tabla 3. Factores pronóstico por FISH:(NCCN), 2015)

Citogenética en interfase (FISH)		
Desfavorable	Neutral	Favorable
Del(11q)	Normal	Del(13q) como única alteración
Del(17p)	+12	

Se deben presentar dichas aberrancias citogenéticas en más del 10% de las células para tener impacto clínico significativo.



En estadios tempranos aproximadamente el 5% presenta alteraciones de la p53.

En etapas de enfermedad con requerimiento de tratamiento aumenta a un 9-10%.

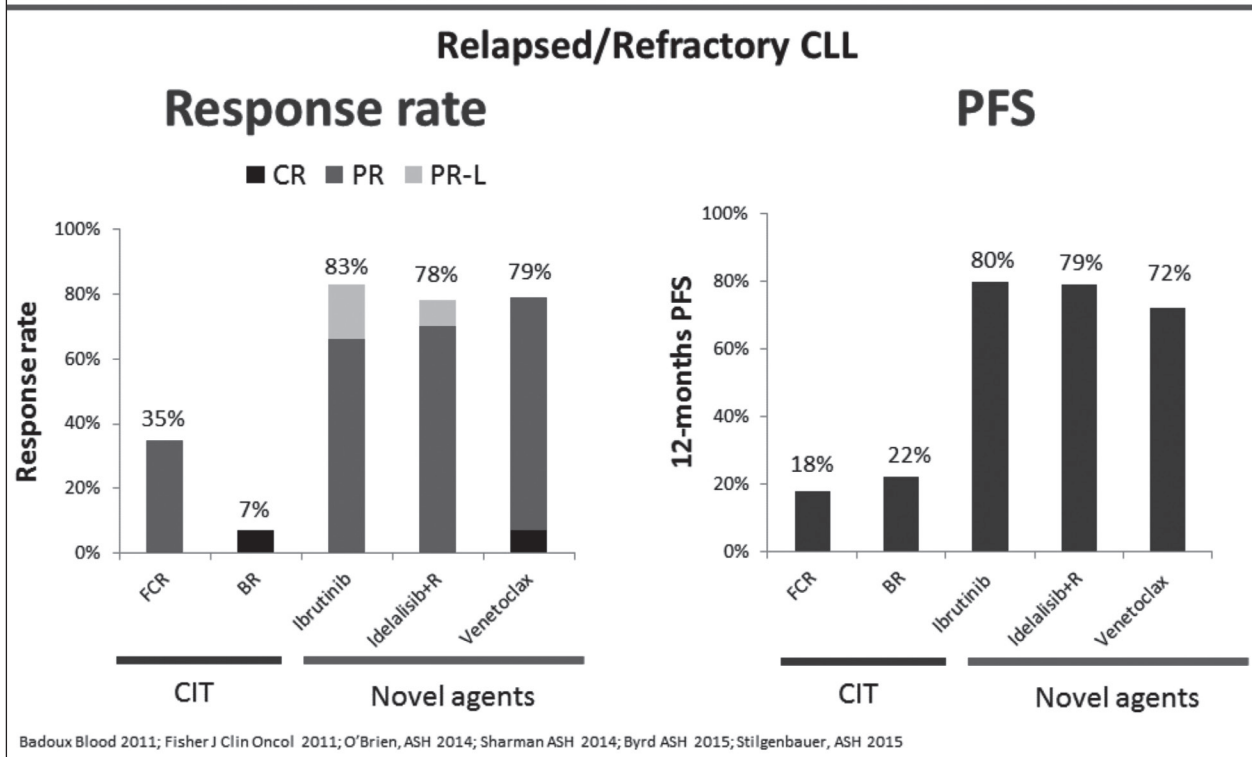
En etapa de recaída refractaria están presentes en casi un 45% (en Richter un 65%).

En estos casos el porcentaje de mutación p53 aisla-

da sin delección 17p asciende a casi el 30%⁽¹⁵⁻¹⁸⁾

La respuesta a los inhibidores de kinasas (ibrutinib, idelalisib, venetoclax) es ampliamente mayor en la LLC en recaída refractaria que a la inunquimioterapia (FCR-BR) en términos de grado de respuesta y progresión libre de enfermedad como se aprecia en la siguiente tabla⁽¹⁹⁻²³⁾.

Chemoimmunotherapy (CIT) vs novel agents in TP53 disrupted CLL



Por consiguiente existen recomendaciones de realizar la TP53: Del 17p en la práctica clínica siempre antes del tratamiento de acuerdo a las pautas de IW-CLL y ERIC.

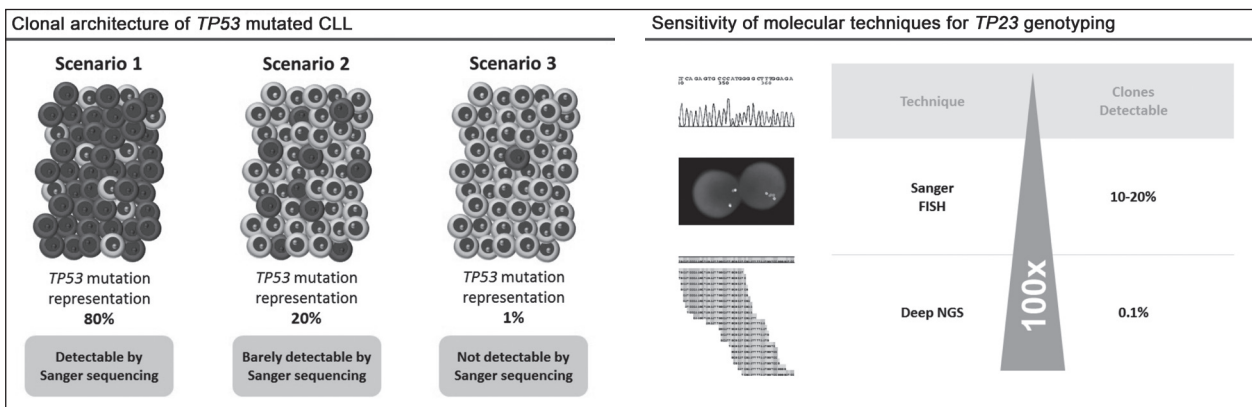
No obstante las pautas de la BCSH, NCCN Y ESMO proponen realizar la citogenética por FISH (del17p) más la mutación contemplando dicho porcentaje de pacientes que no comparten ambas alteraciones y que correrán el mismo patrón evolutivo.

El método de detección de la mutación varía de

acuerdo al método empleado:

La secuenciación Sanger es sensible si la clona está presente en casi más del 80%. Es apenas detectable si es del 20 % aproximadamente y no detecta % bajos de participación.

La secuenciación de próxima generación (NGS) tiene una sensibilidad muchísimo mayor y detecta el 0.1% de subclonas. Éstas podrán seleccionarse y expandirse en la evolución luego de la quimioterapia y durante la progresión. *Figuras adjuntas.*



Harmonization of TP53 mutation analysis. ERIC (European research initiatives in CLL)
[http://www.ericll.org/pages/networks/tp53network/ericmanualfortp53mutationalanalysis/!](http://www.ericll.org/pages/networks/tp53network/ericmanualfortp53mutationalanalysis/)

Factores pronósticos en relación al paciente y a la enfermedad

Estos factores pronósticos identifican pacientes “no aptos” para la toma de decisiones terapéuticas fundamentalmente con respecto al patrón oro de tipo FCR. Están considerados en los distintos grupos o protocolos terapéuticos (MDACC. CLL 8, CLL10. REACH)

Relacionados con la enfermedad:

Tiempo de recaída o progresión de la enfermedad^(24,26).

Discontinuación del tratamiento temprana en pacientes mayores a 70 años.

Relacionados al paciente:

Aumento de la toxicidad hematológica en pacientes mayores a 65-70 años

CIRS alto por encima de 6

Aumento de eventos adversos en pacientes con CIRS elevado

Aumento de infecciones en pacientes mayores a 65 años

Aumento de eventos adversos en pacientes con CrCl disminuido

En la práctica clínica los principales factores que determinan que un paciente no sea candidato al tratamiento inmuno quimioterápico de primera línea al momento actual son:

* Edad: mayores a 70 años. Recordar que la media de pacientes de comienzo de la enfermedad es de aproximadamente 71 años.

* Un puntaje de comorbilidad de CIRS (Cumulative Illness Rating Linn BS, et al. J Am Geriatr Soc. 1968; Hudon C, et al. J Clin Epidemiol. 2007 Scale) mayor a 6.

- Menos de 6 y depuración de creatinina (CrCL) ≥ 70ml/min: “apto o apropiado - GO”;
- > 6 y CrCL < 70 mL/min: “no apto o inapropiado - SLOW GO”;

- Comorbilidades severas y corta expectativa de vida : “Frail o frágil- No Go”- manejo paliativo.

* Un estado funcional de la Escala ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) mayor a 1⁽²⁷⁾.

* Una depuración de creatinina < a 70 ml/min

Factores pronósticos que se asocian con la evolución de la enfermedad:

- Paciente: Edad
- Enfermedad: Estadio Binet / Rai. Tiempo de duplicación linfocitaria
- Expresión Antigénica: CD38, Zap70, CD49d⁽²⁸⁾.
- Serología: B2microglobulina, TK, LDH, sCD23⁽²⁹⁾.
- Genética molecular: otras mutaciones no p53 como NOTCH1, SFRB1

Puntaje Pronóstico para LLC. IPI-CLL

Como era de esperar luego del advenimiento del conocimiento de los factores biológicos predictores incorporados y del conjunto de factores pronosticadores se intentó generar un puntaje pronóstico que contemplara parte de estos marcadores biológicos y clínicos y que categorizaran a los pacientes en grupos de riesgo.

La multiplicidad de los mismos, la información limitada en su valor pronóstico independiente y la interpretación discordante, han sido las barreras en el uso de la práctica clínica diaria.

El grupo de estudio y tratamiento Alemán de LLC realizó un análisis de 23 marcadores pronósticos en LLC basados en resultados prospectivos de 1948 pacientes portadores de LLC⁽³⁰⁾.

Un estudio multivariable de regresión Cox identificó 8 variables independientes predictoras de supervivencia global (OS): sexo, edad, ECOG, del(17p), del(11q), mutación IGHV, beta2 microglobulina, timidina kinasa sérica.

Independent factor		HR* (95% CI†)	P	Risk score
Category according hierarchical model ¹⁷	Del (17p)	6.0 (4.2 - 8.6)	<.001	6
s-TK	>10.0 U/L	2.1 (1.5-2.9)	<.001	2
s-β ₂ m	>3.5 mg/L	2.3 (1.4-3.6)	.001	2

s- β_2 m	>1.7 and \leq 3.5 mg/L	1.7 (1.1-2.7)	.01	1
IGHV MS	Unmutated	1.9 (1.5-2.5)	<.001	1
ECOG PS	>0	1.7 (1.3-2.1)	<.001	1
Category according hierarchical model ¹⁷	Del (11g)	1.4 (1.03-2.0)	.03	1
Sex	Male	1.3 (1.01-1.6)	.026	1
Age	>60 y	1.3 (1.04-1.7)	.045	1

Resultados de la regresión Cox final y scores de riesgo de factores independientes basados en 1223 pacientes. (Hallek et al, 2014)

A partir de éstas se creó un índice pronóstico donde derivan 4 categorías de riesgo con una supervivencia global a 5 años que varía desde 18,7% a 95,2%.

Dicho índice se validó externamente en la Clínica Mayo con 676 pacientes.

Dado el amplio rango en el “hazard ratio” (HR) en los factores independientes, un puntaje de riesgo se asignó a cada factor independiente⁽³¹⁾.

La asignación de puntaje de riesgo se basó en el valor de HR correspondiente a cada factor, (HR de 1.1 a 1.9, se asignó 1 punto en el puntaje de riesgo y así

sucesivamente).

Se definió finalmente que el riesgo total es la suma de los 8 puntajes de riesgo, que corresponde a un rango de 0 a 14.

A partir de esto se definen 4 categorías de riesgo con diferentes supervivencias globales (OS):

- Bajo (puntaje 0 a 2)
- Intermedio (puntaje 3 a 5)
- Alto (puntaje 6 a 10)
- Muy alto (puntaje 11 a 14).

Risk group GCLLSG		No. of patients, N (%)	5-y OS, %	6-y OS, %	HR* (95% CI†)
Low	0-2	300 (24.5)	96.2	94.8	
Intermediate	3-5	460 (37.6)	86.9	80.4	4.8 (2.9-8.0)
High	6-10	410 (33.5)	67.6	55.6	12.5 (7.7-20.5)
Very high	11-14	53 (4.3)	18.7	15.0	57.7 (33.0-101.2)
Risk group Mayo Clinic					
Low	0-2	226 (33.6)	95.2	92.1	
Intermediate	3-5	336 (49.9)	91.4	86.7	1.9 (1.03-3.5)
High	6-10	95 (14.1)	71.7	69.1	5.5 (2.9-10.7)
Very high	11-14	16 (2.4)	13.6	13.6	28.9 (12.3-68.3)

Mediante la aplicación del Índice Pronóstico, se incorporan nuevos factores pronósticos que no se toman en cuenta en la estadificación de Rai y Binet y que incluyen a los factores pronósticos independientes más importantes como son IgVH y del(17p).

Este índice tiene aplicación en identificar pacientes cuya supervivencia amerite un tratamiento alternativo o más agresivo. También permite identificar pacientes en estadios precoces de muy alto riesgo para estudios clínicos que evalúen los beneficios de un

tratamiento precoz y/o un tratamiento ajustado al riesgo.

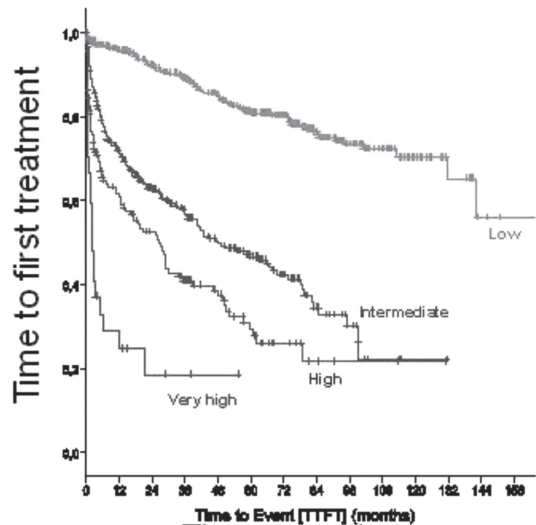
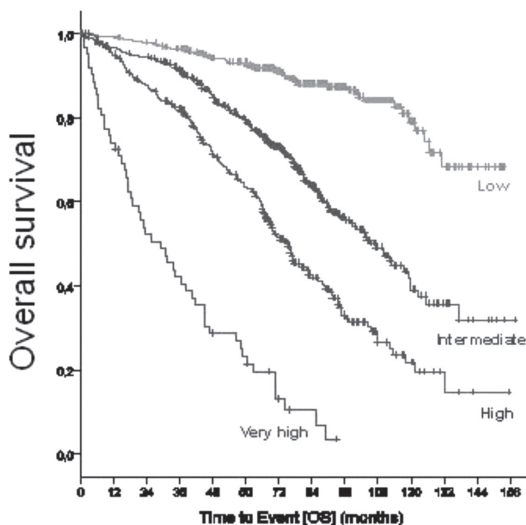
Dado que la timidina kinasa (TK) no se encuentra disponible en muchos países, el grupo Italiano de *Molica y col.* publicaron los resultados que confirman la utilidad del Índice Pronóstico desarrollado por el Grupo Alemán de LLC sin la utilización de

la timidina kinasa en predecir el tiempo para iniciar tratamiento. Además confirman la utilidad de este índice pronóstico en pacientes con LLC en estadios tempranos de la enfermedad⁽³²⁾. Índices similares realizados como el del grupo de MDACC reagrupando parte de estos factores pronósticos arrojan resultados estadísticos similares⁽³³⁾.

Comprehensive approaches incorporating clinical, serum, genetic, and molecular markers into a single risk score: CLL-IPI

Variable	Adverse factor	Coeff.	HR	Grading
TP53 (17p)	deleted and/or mutated	1.442	4.2	4
IGHV status	Unmutated	0.941	2.6	2
B2M, mg/L	> 3.5	0.665	2.0	2
Clinical stage	Binet B/C or Rai I-IV	0.499	1.6	1
Age	> 65 years	0.555	1.7	1
Prognostic Score				0 – 10

Risk group	Score	Patients N (%)	5-year OS, %
Low	0 – 1	340 (29)	93.2
Intermediate	2 – 3	464 (39)	79.4
High	4 – 6	326 (27)	63.6
Very High	7 – 10	62 (5)	23.3



Kutsch N BJ, J Clin Oncol 2015;33(suppl). Abstract 7002; Wierda W, J Clin Oncol 2011;29:4088-4095; Pflug N, Blood 2014;124:49-62

La búsqueda de la mutación P53 por métodos altamente sensibles como la NGS se mantiene para campo de la investigación.

De la misma forma otras mutaciones están en la órbita de la investigación (mutaciones de BTK o PLCG2). Por último la detección de la enfermedad mínima residual (EMR) y la duración de la misma parece tener impacto en el tiempo libre de progresión de la enfermedad o del tiempo de requerimiento de un próximo tratamiento como lo muestran los trabajos en las gráficas de la página siguiente^(34,35).

El Grupo Uruguayo de LLC viene trabajando en otros factores pronósticos en la leucemia linfocítica

crónica como la enzima AID y la lipoproteína lipasa (LPL).

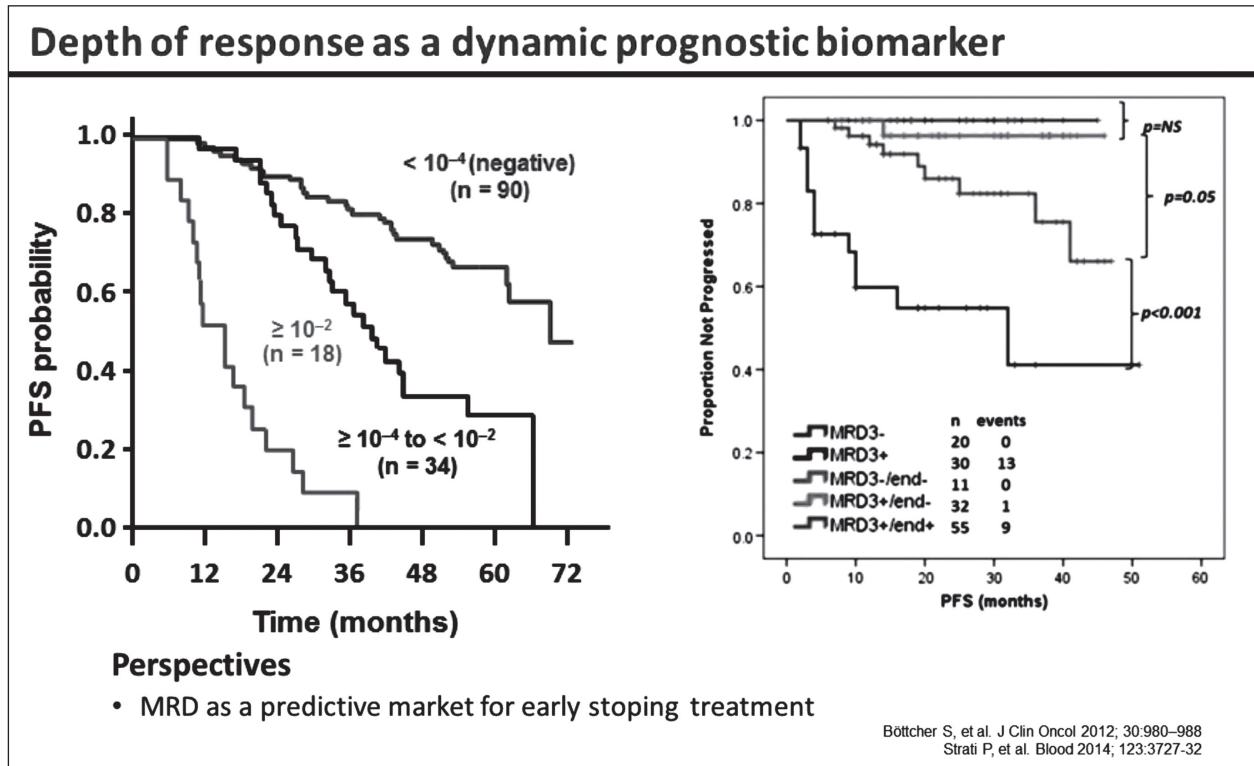
La enzima AID es la responsable de la hipermutación somática y el cambio de clase en el linfocito B luego de la activación en los órganos linfoides secundarios (centros activadores inmunológicos o centros germinales). Arakawa et al^(36,37).

La sobreexpresión de AID ha sido propuesta en jugar un rol oncogénico en los linfomas⁽³⁸⁾ y en estar involucrada en la progresión del linfoma del manto y de la leucemia linfocítica crónica⁽³⁹⁻⁴¹⁾.

Opezzo, Vasconcellos y col. en conjunto con el Grupo Francés de LLC han demostrado que la LPL se

asocia al perfil de las IgVH no mutadas y a la evolución clínica agresiva^(42,43). Los estudios clínicos que viene realizando el Grupo Biológico Clínico para el Estudio y Tratamiento de la LLC en Uruguay, ava-

lan o acompañan el valor pronóstico de la LPL si bien la IgVH aparece como de un valor pronóstico más fuerte. Estos estudios refuerzan también el valor pronóstico de la AID. (no publicado)



Conclusiones.

Dada la heterogeneidad de formas de presentación evolutivas de la LLC, se ha hecho imprescindible contar con los marcadores biológicos “pronósticos” de evolución de enfermedad y “predictivos” de respuesta terapéutica. Estos últimos tendrán impacto en la decisión de tipo de tratamiento ante la incorporación de las nuevas drogas con respecto al tratamiento estándar. El avance en el conocimiento biológico del linfocito B involucrado en los dos contingentes celulares identificados; el mayor conocimiento del BCR, las alteraciones genéticas y moleculares que conllevan a la activación de los pasos de señalización, y las opciones terapéuticas con los nuevos agentes moleculares, hacen que se discuta actualmente cuál es la mejor oportunidad para realizarlos. La mayoría de los autores concuerdan que en la práctica clínica, el análisis de los marcadores “predictivos” como la TP53 (17p delección y mutación P53) debe realizarse antes de comenzar el tratamiento de acuerdo a los criterios vigentes del IWCLL. Muchos grupos de estudio de LLC (BCSH, ERIC,

NCCN, y ESMO) recomiendan además de la búsqueda de las alteraciones citogenéticas convencional y por FISH, el estudio de la mutación P53 dado el porcentaje de hallazgos positivos aislados, que crece ante la progresión y recaída de la enfermedad. El perfil mutacional de las IgVH está recomendado como “deseable” también antes de la decisión terapéutica pero con menos fuerza de recomendación si se dispone del análisis de la TP53.

Por otra parte todos los marcadores biológicos “pronósticos” de estadio y de actividad de la enfermedad son recomendados realizarlos en la evaluación al comienzo de la enfermedad.

El puntaje IPI en la LLC que incorpora marcadores clínicos, serológicos, genéticos y moleculares vuelca 4 categorías de riesgo de la enfermedad con diferencias significativas de sobrevida que nos obligan a proponer la estrategia terapéutica en cuanto oportunidad y tipo. La armonización del estudio de NGS para la detección de alta sensibilidad de la mutación P53; el estudio y monitoreo de nuevas mutaciones,

la determinación de EMR para guiar el tratamiento, así como las evaluaciones biológicas al diagnóstico para intervenciones terapéuticas tempranas, se mantienen dentro del campo de la investigación.

Declaración de conflictos de interés:

El autor declara que no posee conflictos de interés.

Bibliografía

1. Rossi D.; Prognostic and predictive factors in the era of new targeted therapies. Education Session - Chronic lymphocytic leukemia. EHA . Copenhagen, Jun 10, 2016
2. Schroeder HW Jr, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today*. 1994 Jun;15(6):288-94.
3. Dighiero G. Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2385-91
4. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, y col. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2012;209(12):2183-98.
5. Maloum K, Davi F, Merle-Béral H, y col. Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2000 Jul 1;96(1):377-9.
6. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, y col. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1848-54.
7. Chiorazzi N1, Hatzi K, Albesiano E. B-cell chronic lymphocytic leukemia, a clonal disease of B lymphocytes with receptors that vary in specificity for (auto)antigens. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Dec;1062:1-12
8. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, y col. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*. 2016 Jan 14;127(2):208-15.
9. Coelho V, Krysov S, Steele A, y col. Identification in CLL of circulating intraclonal subgroups with varying B-cell receptor expression and function. *Blood*. 2013;122(15):2664-72.
10. D'Avola A1, Drennan S2, Tracy I2, y col. Surface IgM expression and function associate with clinical behavior, genetic abnormalities and DNA methylation in CLL. *Blood*. 2016 Jun 14.
11. Sameer A. Parikh, Paolo Strati, y col. Should IGHV status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review and meta-analysis *Blood* 2016 127:1752-1760
12. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, y col. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524-9.
13. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A y col. Genomic Aberrations and survival in chronic lymphocytic leukaemia. *New England Journal of Medicine* . *N Engl J Med*. 2000 Dec 28;343(26):1910-6
14. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, y col. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014 May 22;123(21):3247-54.
15. Rossi D, Gaidano G. ATM and chronic lymphocytic leukemia: mutations, and not only deletions, matter. *Haematologica*. 2012 Jan;97(1):5-8.
16. Rossi D, Khiabani H, Spina V, y col. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 Apr 3;123(14):2139-47.
17. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, y col. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 10;28(29):4473-9.
18. Zainuddin N, Murray F, Kanduri M, y col. TP53 Mutations are infrequent in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2011 Feb;35(2):272-4.
19. Burger J, Keating M, Wierda W, O'Brien S, y col. Safety and activity of ibrutinib plus rituximab for patients with high-risk chronic lymphocytic leukaemia: a single-arm, phase 2 study *Lancet Oncol*. 2014 Sep;15(10):1090-9.

20. Byrd JC1, Furman RR, Coutre SE, y col. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia *N Engl J Med*. 2013
21. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, y col. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014 Mar 13;370(11):997-1007
22. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, y col. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(22):3390-7.
23. Kutsch N, Hallek M, Eichhorst B. y col. Emerging therapies for refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2015 Feb;56(2):285-92.
24. Tam CS, Seymour JF. A new prognostic score for CLL. *Blood*. 2014 Jul 3;124(1):1-2.
25. Rossi D, Terzi-di-Bergamo L, De Paoli L, y col. Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015 Oct 15;126(16):1921-4.
26. Fink AM, Böttcher S, Ritgen M, y col. Prediction of poor outcome in CLL patients following first-line treatment with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1949-52.
27. Oken M. et all. (1982). Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *American Journal of Clinical Oncology*, 649-655
28. Damle RN1, Wasil T, Fais F, y col. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1840-7.
29. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, y col. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma*. 1996 Aug;22(5-6):439-47.
30. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD Hallek M y col.. Development of a comprehensive prognostic index for patients with CLL. *Blood*. 2014 Jul 3;124(1):49-62.
31. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2015 May;90(5):446-60.
32. Molica S, Giannarelli D, Mirabelli R, y col.. Unavailability of thymidine kinasa does not preclude the use of German comprehensive prognostic index. *Eur J Haematol*. 2016 Jan;96(1):72-7.
33. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, y col. Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J ClinOncol*. 2011 Nov 1;29(31):4088-95.
34. Strati P, Keating MJ, O'Brien SM, y col. Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL. *Blood*. 2014 Jun 12;123(24):3727-32.
35. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, y col. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J ClinOncol*. 2012 Mar 20;30(9):980-8.
36. Arakawa H, Hauschild J, Buerstedde JM. Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science*. 2002 Feb 15;295(5558):1301-6.
37. Opezzo P, Dighiero G. What do somatic hypermutation and class switch recombination teach us about chronic lymphocytic leukaemia pathogenesis? *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;294:71-89.
38. Pérez-Durán P, de Yébenes VG, Ramiro AR. Oncogenic events triggered by AID, the adverse effect of antibody diversification. *Carcinogenesis*. 2007 Dec;28(12):2427-33.
39. Klemm L, Duy C, Iacobucci I, y col. The B cell mutator AID promotes B lymphoid blast crisis and drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2009 Sep 8;16(3):232-45. doi: 10.1016/j.ccr.2009.07.030.
40. Heintel D, Kroemer E, Kienle y col. German CLL Study Group. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA

- is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2004 Apr;18(4):756-62
41. Palacios F, Moreno P, Morande P, y col. High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood*. 2010 Jun 3;115(22):4488-96.
 42. Oppezzo P, Vasconcelos Y, Settegrana C, y col. Grupo Cooperativo Francés de LLC. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005 Jul 15;106(2):650-7. Epub 2005 Mar 31.
 43. Moreno P, Abreu C, Borge M, y col. Lipoprotein lipase expression in unmutated CLL patients is the consequence of a demethylation process induced by the microenvironment. *Leukemia*. 2013 Mar;27(3):721-5.