

Leucemia linfocítica crónica. Experiencia argentina.

Chronic lymphocytic leukemia.
The experience in Argentina.

Juan Dupont

CEMIC. Buenos Aires

jcdupont643@gmail.com



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

HEMATOLOGÍA

Volumen • 20

Número Extraordinario: 140 - 151
I Jornada Latinoamericana de la SAH:
Agosto 2016

Palabras clave: leucemia linfocítica crónica,
epidemiología,
citometría de flujo,
citogenética.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia,
epidemiology,
flow cytometry,
cytogenetics.

Introducción

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una proliferación neoplásica de linfocitos B de aspecto microscópico maduro con una incidencia de 4-5/millón/año en la población occidental. El comportamiento neoplásico es considerado regularmente indolente y en aproximadamente dos tercios de los diagnósticos efectuados, no es determinante de tratamiento. En el tercio restante en forma inicial y en los pacientes originalmente indolentes que luego progresan, una serie de decisiones terapéuticas han logrado controlar sintomáticamente a la enfermedad y en algunos casos prolongar su supervivencia global. Una cantidad de elementos clínicos y biológicos han sido asociados a su pronóstico y con frecuencia

a la elección de los recursos terapéuticos⁽¹⁾. La experiencia argentina ha acompañado al conocimiento global de la enfermedad y su tratamiento, y es el motivo de la reseña siguiente.

Recursos utilizados para la reseña

Para efectuar el actual trabajo se ha recurrido a: 1) estudios publicados en revistas indexadas, 2) comunicaciones a congresos de la especialidad, 3) recursos de la Sociedad Argentina de Hematología (SAH): guías de diagnóstico y tratamiento, Registro Argentino de Enfermedades Hematológicas (RAEH), Subcomisión de LLC y premios de la SAH, 4) datos de estudios del GATLA (Grupo Ar-

gentino de Tratamiento de la Leucemia Aguda), y 5) contribuciones personales de datos no publicados. Se han incluido también datos epidemiológicos de la Sociedad Boliviana de Hematología.

La experiencia argentina (en contexto)

Datos epidemiológicos

Se considera a la LLC una enfermedad más frecuente en individuos adultos de la séptima década. El primer registro (RAEH) con un capítulo para LLC,

lo produce la SAH a partir de 2011. El mismo está abierto para pacientes (pts) de reciente diagnóstico⁽²⁾. Se han reportado al RAEH 245 pts, con una edad promedio de 67 años (35-65), con un predominio de género masculino (1.5/1). En la **Figura 1** se aprecia además que la mayor parte de los pacientes reportados (77%) fueron a ese momento asintomáticos. Es de interés que en la región andina no se ha producido información (**Figura 2**).

Figura 1

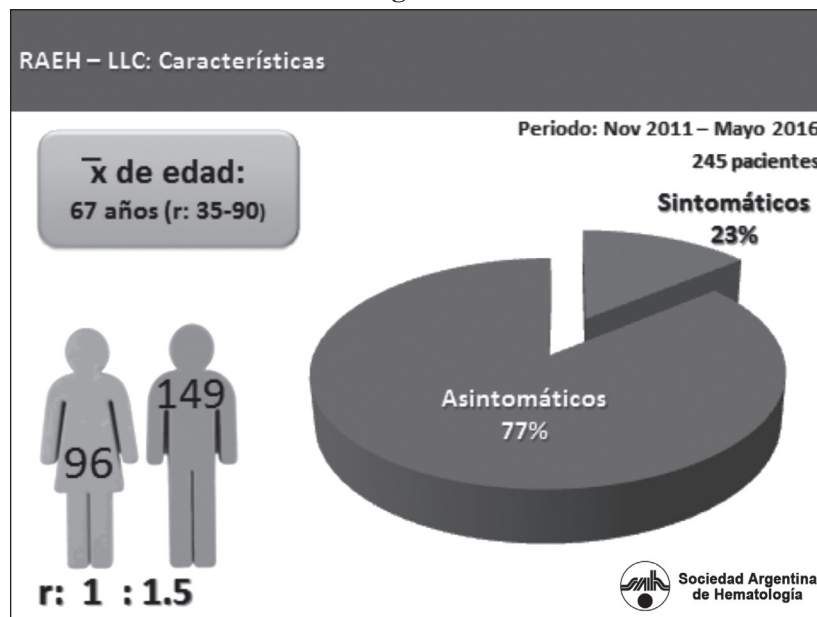
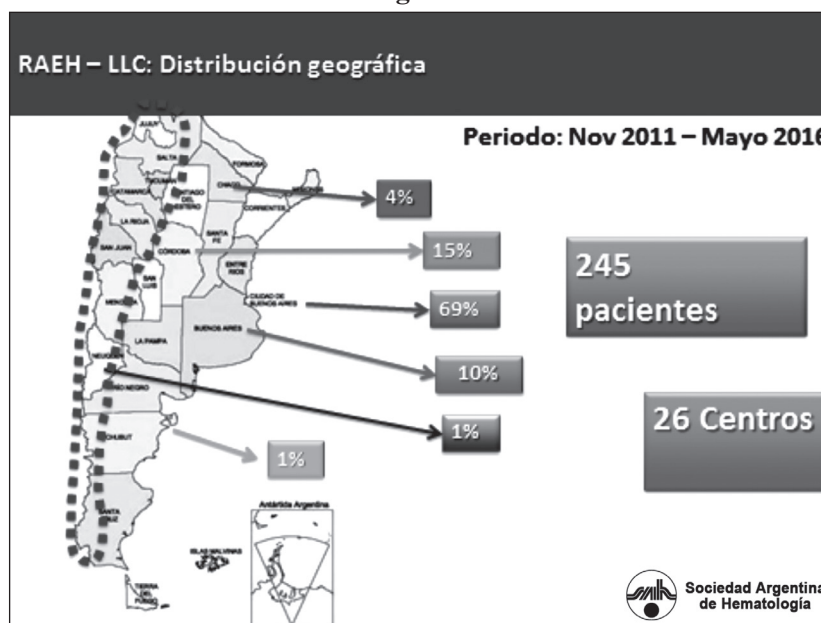


Figura 2



En un registro de comienzo reciente, los motivos pueden ser variados. Uno de ellos es que la influencia étnica de pueblos originarios en la región puedan tener una incidencia menor que las poblaciones de la zona central de Argentina que tienen un impacto étnico de mayor influencia europea (caucásica). Para despertar interés en esta observación, que el RAEH podrá contestar a futuro, se ha consultado un registro único de leucemias en Bolivia. La LLC es 5 veces menos frecuente que la LMC en Bolivia. La LLC constituye el 5,7% de todas las leucemias⁽³⁾, incidencia 0,2/100.000 (EEUU: 30%, 4/100.000 resp) y los autores argumentan que probablemente esta notable diferencia se deba a la menor expectativa de vida de la población boliviana, que actualmente es de 68,34 años según el Instituto Nacional de Estadística⁽⁴⁾. Hay que recordar que la expectativa de vida en Argentina es de 75,34 años⁽⁵⁾. Información no publicada de hematólogos de Perú y México abonan el concepto de menor incidencia relacionado a las etnias. Estas observaciones son similares en Japón: la incidencia anual de LLC es 0,48/100.000 (4-5 veces menor que en los países occidentales)⁽⁶⁾ y que la LLC típica representa sólo 50% de leucemias de células B indolentes en población japonesa (tan frecuente como linfoma del manto)⁽⁷⁾. La expectativa de vida en Japón es de 87.3 años⁽⁸⁾.

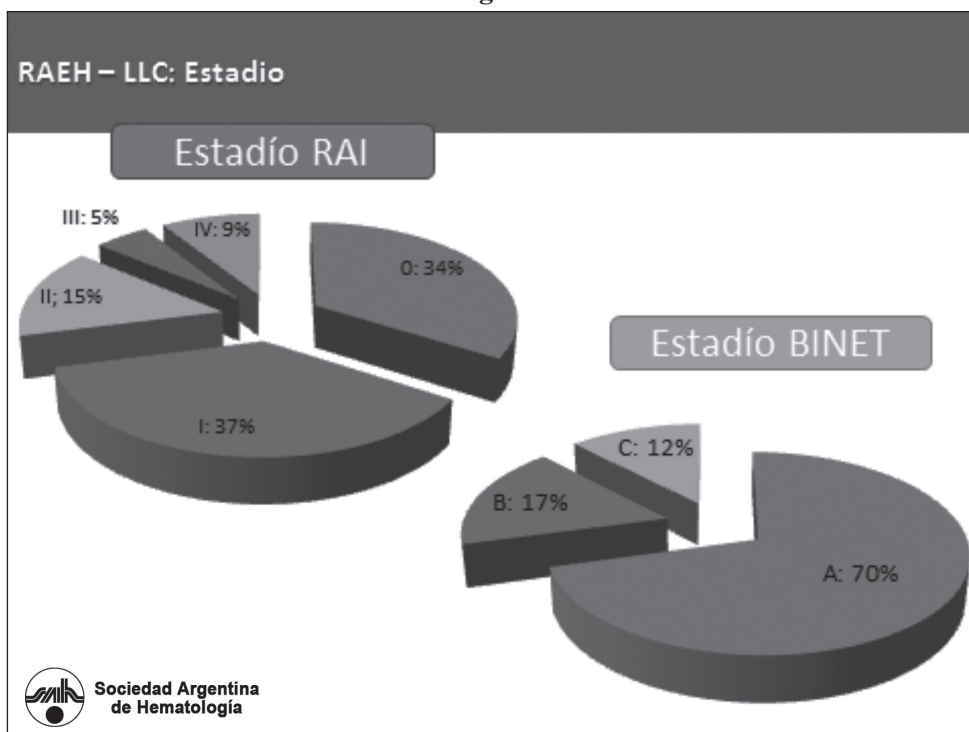
Guías de diagnóstico y tratamiento

La SAH ha producido sus guías durante los últimos 10 años con una periodicidad bianual⁽⁹⁾. Es un recurso de información de utilidad cotidiana, tanto para los hematólogos como clínicos en la práctica diaria. Las guías sintetizan además las recomendaciones terapéuticas y son regularmente consultadas por administradores de entidades de salud.

Datos clínicos

Se ha asociado además la extensión de órganos linfáticos involucrados y las citopenias concurrentes con el pronóstico clínico y las decisiones terapéuticas. Hace 40 años, con datos obtenidos del GATLA y del IIHema-ANM, Pujal G, Pavlosvsky S y Pavlovsky A publican la primera retrospectiva de la influencia de los estadios clínicos establecidos por Rai y por Binet. Aunque no es posible extrapolar los datos de entonces a los actuales, los mismos revelaron que la enfermedad avanzada se relaciona con un pronóstico adverso. En ese estudio, los estadios de Rai 0, 1 y 2, y los Binet A y B, tenían una supervivencia media (SM) aproximada superior a los 7 años y los estadios Rai 3 y 4 y los Binet C, una SM de 2 años y medio. El RAEH⁽²⁾ ha identificado los estadios clínicos de los 246 pacientes registrados y la proporción de estadios Binet A y RAI 1 & 2, fueron 70 y 71% respectivamente (**Figura 3**).

Figura 3



Datos morfológicos

El registro no tiene datos maduros al respecto, pero será posible extraer correlación con elementos morfológicos por el porcentaje de elementos inmaduros (prolinfocitos), que aún dentro del rango aceptado para diagnóstico (<35%), su incremento por más de 10% tiene implicancias pronósticas (SV a 10 años 30 vs 3 % p=0.0001) y asociación significativa con elementos biológicos de pronóstico adverso, como la expresión de CD38 elevada, el estado mutacional de IGHV >98%, ausencia de del(13) y mutación del NOTCH1⁽¹⁰⁾. Otro elemento morfológico de valor predictivo es el porcentaje de sombras nucleares (Gumprecht, *smudge cells*) como indicativo de estado apoptótico; en dos estudios más de 30% están asociados a SV a 5 años de 81% vs 51% (P < .001) los de menos de 30%⁽¹¹⁾ y además con mayor correlación con el estado mutacional de IGHV >98%⁽¹²⁾.

Vitamina D

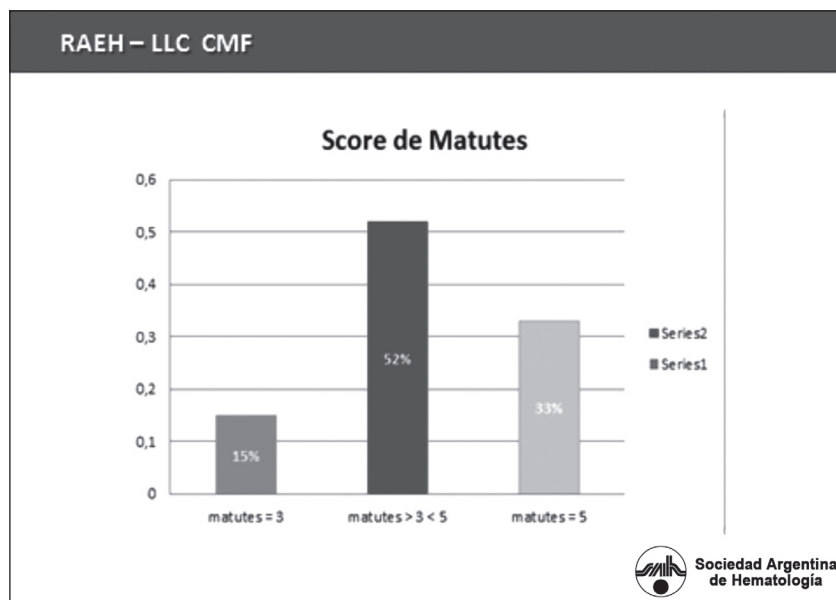
Los estudios sobre el impacto de los niveles bajos de vitamina D han sido asociados con factores de peor pronóstico y disminución de la supervivencia global⁽¹³⁾. Bezares RF y col., en una cohorte retrospectiva de 57 pts, identifica un 20% de pts con determinación de vit D inferior a 20 ng/ml. La LDH, beta2M y los estadios avanzados estaban asociados a niveles bajos de vit D. Igualmente los pts. con niveles bajos tuvieron una supervivencia media estimada de 4 años contra 8 años de los normales⁽¹⁴⁾ (Fi-

gura 4). El RAEH recolecta datos sobre vitamina D.

Citometría de Flujo

Además de la tipificación clínica y morfológica, la biológica ganó espacio, no sólo en el diagnóstico sino también en la decisión terapéutica. El RAEH analiza el fenotipo por citometría de flujo y se revela para la población denunciada, que el llamado puntaje de Matutes⁽¹⁵⁾ (Ig de membrana débiles, CD5+, CD23+, FMC7-, CD79b-) se cumple en 4 y 5 puntos en el 85% de los casos denunciados (Figura 4). El puntaje de Matutes así anunciado en 1994, ha sido útil para el diagnóstico de certeza en LLC. El CD38 ha sido investigado como factor de pronóstico por el grupo de FUNDALEU. Pavlovsky C y col. determinan que, con un seguimiento de 53 meses (rango 6-282), el 62% de los pts CD38+ requirieron tratamiento. La SLP y la SG a los 84 meses fue significativamente menor para los pts CD38+: 20 y 71% respectivamente, en comparación con los pts CD38-: 70 y 96%⁽¹⁶⁾. El RAEH también toma en cuenta otros marcadores como CD200, que ha demostrado capacidad diagnóstica diferencial con la principal neoplasia CD5+, que es el linfoma de la zona del manto⁽¹⁷⁾, y que también puede tener implicancia pronóstica en tiempo a tratamiento y supervivencia (mejor) en los pts CD200+ con mayor expresión⁽¹⁸⁾. El RAEH ha recolectado datos del puntaje de Matutes, y el 85% de los pacientes tuvieron puntaje 4 y 5 (**Figura 4**)

Figura 4. RAEH. Citometría de flujo. Puntaje de Matutes



Citogenética

Las anomalías citogenéticas son parte del estudio de los pts con LLC en los que es necesario tomar una decisión terapéutica por progreso de la enfermedad. El laboratorio de citogenética de la ANM-IIHema ha producido información sobre las anomalías citogenéticas de la LLC. En sus estudios mostraron 46,3% de los pacientes con alteraciones cromosómicas clonales por citogenética convencional y 80,7% por FISH. La trisomía 12 se encontró en el 21,9%

de los pacientes mediante el análisis de bandejo G y en el 35% en estudios de FISH. Se observó pérdida alélica de 13q14 en 63,2% de los pacientes; 11% de los pacientes mostraron monosomías TP53. La coexistencia de la trisomía 12 y delección 13q14 se encontró en 17,5% de los pacientes. En este grupo, la delección 13q14 fue el clon prevalente, con porcentajes de 25-35% más altos que los observados para la trisomía 12, lo que sugería evolución clonal⁽¹⁹⁾ (Figura 6).

Figura 5. Vitamina D en LLC

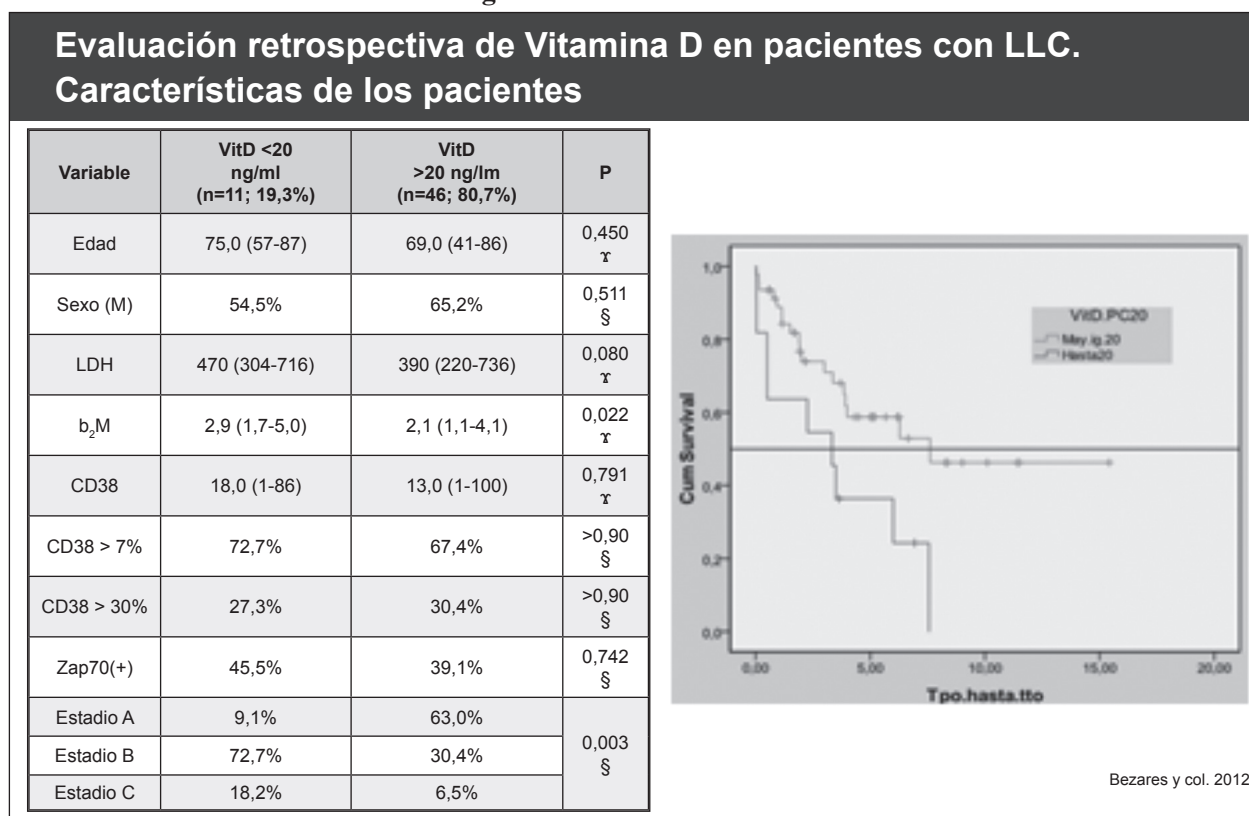
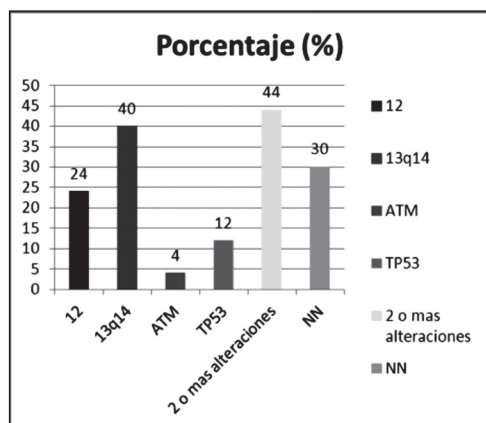


Figura 6. Proporción de anomalías citogenéticas en LLC (laboratorio de citogenética ANM-IIHema)



Los mismos autores (Slavutsky I) hallaron 38 anomalías estructurales no descritas previamente en la literatura, 28 (74%) de ellas eran translocaciones. En los casos con cariotipos complejos, los cromosomas 6, 8 y 13 fueron los más frecuentemente implicados en las nuevas alteraciones (nueve cada uno), seguido de los cromosomas 12, 14 y 15 (seis cada uno)⁽²⁰⁾.

Los casos con cariotipos complejos tenían una menor proporción de pacientes en estadio Rai 0 (15,4% vs. 75%) (p = 0,005) y más altos niveles de β2M (3,3 vs. 2,5 mg/ml, p = 0,037) que aquellos con cariotipos simples. Además se observó un tiempo a próximo tratamiento más corto (13 meses) y la su-

pervivencia global (56 meses) en el grupo de cariotipos complejos en comparación con los controles (69 y 144 meses, respectivamente $p = 0,015$ y $p = 0,005$, respectivamente). En múltiples estudios, la delección del brazo corto del cromosoma 17-del(17p), que se asocia con una anomalía funcional de TP53, identifica a pacientes con rápida progresión con los tratamientos convencionales. Fischer y col lo sintetiza para el estudio colaborativo de origen alemán CLL8⁽²¹⁾.

Estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGHV)

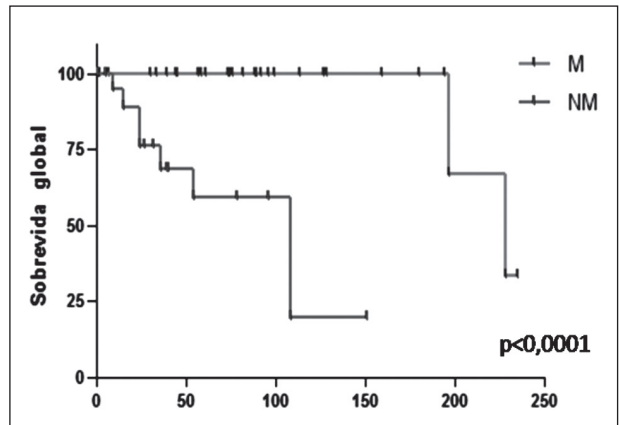
La mutación somática de los genes que conforman las cadenas VH de las inmunoglobulinas de los linfocitos B normales es un evento clave en el incremento de la diversidad de anticuerpos durante la maduración de la respuesta inmune. Tiene valor pronóstico conocido desde hace más de una década y es en forma reiterada un factor de pronóstico adverso cuando la homología con la línea germinal es superior al 98% (no mutada)⁽²²⁾.

Nuestro grupo de CEMIC estudió en 2003 un grupo pequeño y heterogéneo de 20 pts con LLC en diferentes estadios de evolución. Fue parte de un estudio de comportamiento biológico in vitro de las células de LLC incubadas con oligonucleótidos sintéticos. En ese estudio 10 pacientes eran mutados y tenían mayor cantidad de elementos clínicos de mejor pronóstico⁽²³⁾.

En forma más amplia, el laboratorio de citogenética de ANM-IIHema publica datos del estado mutacional de IGHV en 75 pacientes⁽²⁴⁾. Cuarenta y tres (58,9%) casos fueron hipermutados (HM), mientras que los 30 restantes (41,1%) fueron clasificados como no mutados (NM). Existió asociación entre el estado mutacional y los elementos clínico/biológicos de pronóstico. Los HM tenían menor carga tumoral (Rai 0 = 41,4%) en comparación con los NM (Rai 0 = 25,9%), más citogenéticos de buen pronóstico (del(13): 48% vs 24%). La trisomía 12 (12%) y las anomalías 11q y 17p (11,7%), consideradas de peor pronóstico, fueron más frecuentes en los NM ($p = 0,003$). La familia IGHV más utilizada fue IGHV3-23 (10,8%) y los datos difieren de los asiáticos, brasileños y uruguayos. El registro RAEH actualmente facilita el acceso a los estudios de estado mutacional a través del laboratorio de citogenética

de la ANM-IIHema, de los pts que sean incluidos en el RAEH⁽¹⁾. Los datos se han expandido a 175 pts actualmente (comunicación Dra. Slavutsky) (Figura 7).

Figura 7. Supervivencia global de los pacientes con LLC según estado mutacional de IGHV (RAE/ANM-IIHema)



Tesis Patricia Dos Santos, 2016

Estudios sobre terapéutica

El GATLA inauguró en la Argentina la forma de trabajo en grupos cooperativos. Su primer trabajo en LLC fue el protocolo 3-LLC-76. Se estratificaron 161 pacientes de acuerdo a su estadio y los pacientes con estadio 0 no recibieron tratamiento, los pacientes con estadios I y II (o A y B) asignados a recibir clorambucilo (CLB) y prednisona vs. abstención y los pacientes con enfermedad avanzada (estadios II y IV o C) a recibir CLB-Pred vs COPx2 + CLB-Pred. Los resultados tienen en la actualidad valor histórico y se puede destacar que CLB-Pred no fue diferente a CVP+CLB-Pred, y que la respuesta y la SV estaban en relación a la extensión de la enfermedad. También tiene valor el concepto de que el sólo diagnóstico de la LLC no es determinante terapéutico⁽²⁵⁾.

Otro estudio del GATLA (LLC-95) contribuyó a la incorporación de la fludarabina en el armamento terapéutico de la LLC. Raimundo Fernando Bezares colaboró en el estudio LRF CLL4 liderado por Catovsky y col. En el mismo se analizaba el efecto de la combinación de fludarabina y ciclofosfamida comparado con fludarabina o clorambucilo como monodroga. Las tasas de respuesta completa y global fueron mejores con fludarabina y ciclofosfamida que con fludarabina (tasa de respuesta completa

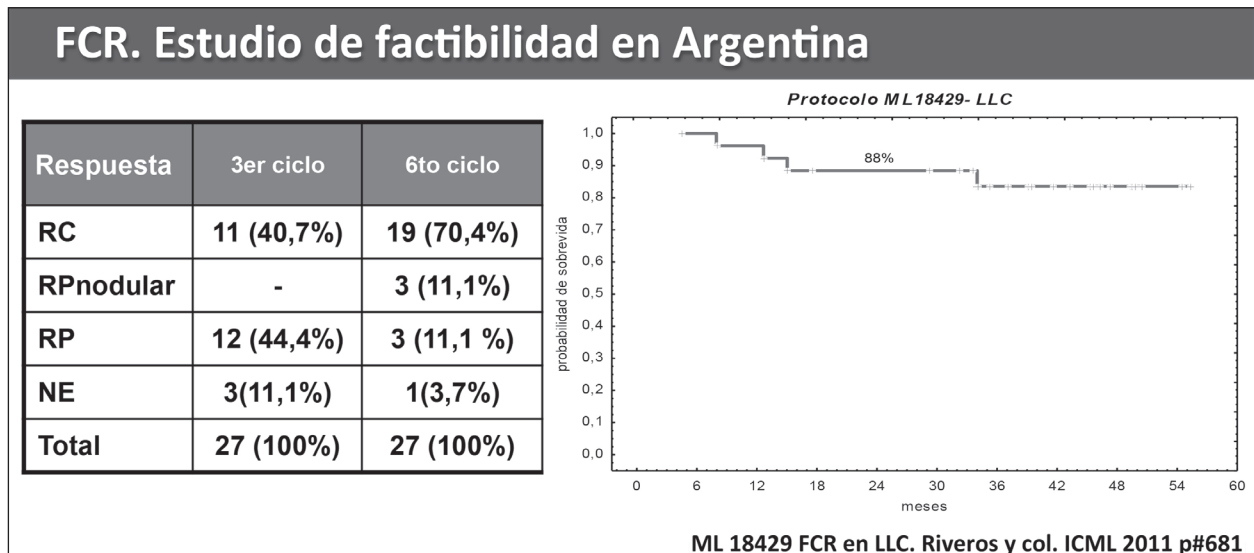
de 38% vs 15%, respectivamente; tasa de respuesta global del 94% vs 80%, respectivamente; $p < 0,0001$ para ambas comparaciones), que eran a su vez mejor que con clorambucilo (tasa de respuesta completa 7%, la tasa de respuesta global 72%; $p = 0,006$ y $0,04$, respectivamente). La supervivencia libre de progresión a los 5 años fue significativamente mejor con fludarabina y ciclofosfamida (36%) que con fludarabina (10%) o clorambucilo (10%; $p < 0,00005$). Fludarabina más ciclofosfamida fue la mejor combinación para todas las edades, incluidos los pacientes mayores de 70 años, y en los grupos de pronóstico definidos IGHV y citogenética, las cuales fueron analizadas en 533 y 579 casos, respectivamente⁽²⁶⁾. El estudio GATLA 8-LLC-02 con un esquema de combinación comparable al CLL4 cooperativo.

La aparición de alemtuzumab en la terapéutica de LLC generó expectativas que fueron contrabalanceadas por su toxicidad, particularmente las citopenias y reactivación de la infección por citomegalovirus. Bezares, con el objetivo de mejorar la tolerancia, exploró dosis disminuidas de alemtuzumab (Campath): 10 y 20 mg sem 1, 30 mg x 2 en sem 2-3, luego una reducción de 30 mg cada 2-4 y 6 sem hasta el año. Se lograron RC de 31 (51%), RP de 27 (44%) y RG 58 (95%). El régimen fue bien tolerado con pocas infecciones por citomegalovirus (CMV) y toxicidad leve. Con un seguimiento medio de 27 meses, la supervivencia global (46% a los 3 años) aparentó ser similar a la de otros regímenes, aunque

con un menor número de eventos adversos. Concluía que alemtuzumab a una dosis reducida parecía ser seguro y aumentaba la supervivencia libre de eventos de los pacientes con LLC en recaída/refractaria, en comparación con la dosis estándar⁽²⁷⁾. Aún así, el uso de alemtuzumab fue discontinuado en 2012 por la propia empresa productora.

A partir de la llegada de la combinación de fludarabina, ciclofosfamida y la adición de rituximab, el tratamiento de la LLC en pacientes en buena condición física y relativamente más jóvenes quedó signado por los resultados del estudio CLL8⁽²⁸⁾. En Argentina, Riveros y col⁽²⁹⁾, para un estudio de factibilidad para el FCR, 27 pacientes lograron una remisión completa del 70%, una remisión parcial nodular de 11% y una remisión parcial del 11% después del 6to ciclo. El 88% de los pacientes estaban vivos a los 4 años (**Figura 8**). Existe una proporción de pacientes considerados aptos para recibir FCR, que aún así no toleran completar los seis ciclos planeados originalmente. Pavlovsky C y col, comunican un grupo de 35 pts en esa condición (no tolerancia por citopenias) dentro de 150 pts tratados con FCR. Los 35 tenían enfermedad residual mínima negativa ($< 10^{-4}$). La SLP y la SG a los 72 meses fue del 46% y 68%, respectivamente. Los autores consideran que lograr la ERM negativa aún con sólo 4 ciclos de FCR, mantiene la eficacia del tratamiento, y recomiendan un estudio comparativo.

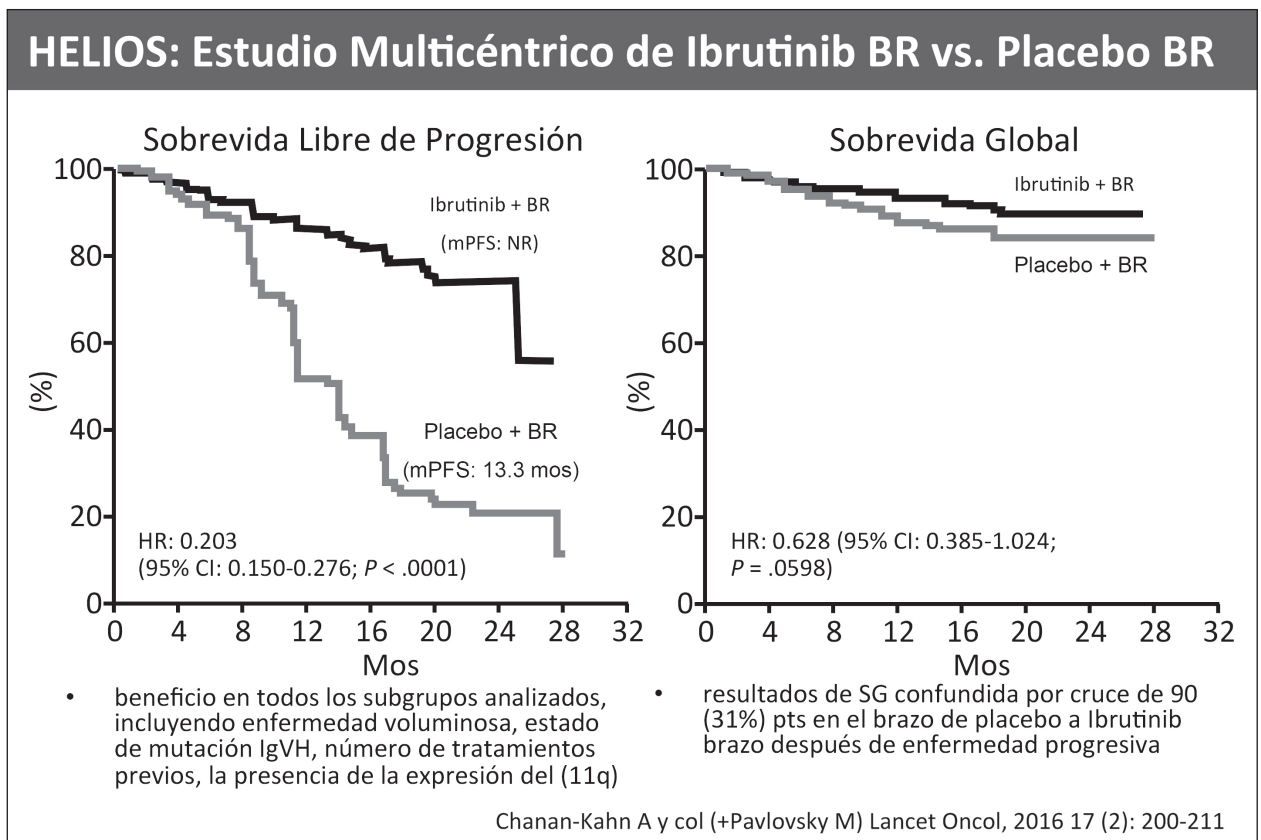
Figura 8. Fludarabina, ciclofosfamida y rituximab en LLC



Durante la última década se conocieron las particularidades de la señalización a través del receptor B linfocitario (BCR) y las vías apoptóticas. Una serie de drogas con blanco definido como el ibrutinib, idelalisib y venetoclax, diseñadas para inhibir a la kinasa Bruton, a la kinasa PI3K y inductor de apoptosis respectivamente, irrumpieron en el escenario de los estudios clínicos. La experiencia argentina comienza por el estudio de exploración en 8 pts con ibrutinib en pacientes recaídos o refractarios de Pavlovsky MA y col.⁽³⁷⁾ y la participación del mismo autor en el estudio Helios publicado por Chanan-kahn y

col⁽³⁰⁾ en el que 578 pacientes elegibles fueron asignados aleatoriamente a ibrutinib o placebo en combinación con bendamustina más rituximab (289 en cada grupo). Con una mediana de seguimiento de 17 meses, la supervivencia libre de progresión mejoró significativamente en el grupo ibrutinib en comparación con el grupo placebo (no se había llegado en el grupo ibrutinib vs 13,3 meses en el grupo placebo, $p < 0.0001$). Se concluyó que en los pacientes que pueden beneficiarse de bendamustina más rituximab, la adición de ibrutinib a este régimen resulta en mejoras significativas en el resultado (**Figura 9**).

Figura 9. Estudio HELIOS



Estudios experimentales

El grupo de trabajo del Laboratorio de Inmunología Oncológica (Instituto de Medicina Experimental (IMEX) CONICET-Academia Nacional de Medicina) investiga desde hace casi 20 años distintos aspectos de la patogénesis de la LLC, en particular los relacionados con las células no malignas del microambiente y el efecto que sobre ellas ejercen los agentes terapéuticos más utilizados. Demostraron la relevancia de las células de estirpe mieloide para prolongar la supervivencia de las células leucémicas

a través de la secreción de factores solubles como interferón gamma⁽³¹⁾ (o galectina 1⁽³²⁾). En sus estudios con fludarabina encontraron que, además de su actividad citotóxica, la droga presenta actividad pro-inflamatoria sobre linfocitos T y monocitos. Más recientemente se abocaron al análisis de moléculas responsables del tráfico linfocitario entre la sangre y los tejidos linfáticos. Demostraron que la quimiocina CXCL12 actúa como quimioattractante y coestimulador de los linfocitos T de pacientes con

LLC⁽³³⁾. Asimismo encontraron que la expresión de los receptores para S1P (esfingosina-1-fosfato), factor responsable de la salida de los linfocitos desde los tejidos a la sangre, es inhibida por señales del microambiente e incrementada por inhibidores de la quinasa Syk⁽³⁴⁾. Teniendo en cuenta la reciente combinación de ibrutinib con anticuerpos monoclonales, investigaron si el inhibidor es capaz de interferir con la capacidad fagocítica de los macrófagos encontrando que, efectivamente, el tratamiento con ibrutinib reduce la fagocitosis de células LLC opsonizadas con rituximab⁽³⁵⁾.

Conclusiones

La experiencia argentina ha sido rica en información clínica, terapéutica, en estudios diagnósticos de origen biológico, genético y molecular. En el pasado reciente se han agregado estudios experimentales que orientan al origen de la proliferación celular y la capacidad del medio ambiente en proteger el crecimiento del clon anómalo de la LLC. Se han desarrollado metodologías de laboratorio que permitirían deducir el comportamiento de fármacos combinados con la impredecible dinámica *in vivo*. Más recientemente, los estudios epidemiológicos han retomado interés para definir incidencia por áreas y etnias. La participación argentina ha sido creciente en estudios de desarrollo de drogas (químicas y biológicas) nuevas de gran impacto en el futuro de los pacientes que requieren tratamiento y tienen factores de pronóstico clínicos y biológicos adversos. En síntesis, nuestro medio clínico y básico está preparado para intensificar el desarrollo de conocimientos y experiencia clínica en LLC durante el futuro próximo.

Agradecimientos

A todos los autores citados de la bibliografía argentina, que han brindado información adicional a la publicada. En particular a Raimundo Fernando Bezares por su histórica e incansable preocupación por la leucemia linfocítica crónica, a los Laboratorios de la Academia Nacional de Medicina, su Instituto de Medicina Experimental relacionado al Consejo Nacional de Ciencia y Técnica y representados en esta publicación por las Dras. Irma Slavutsky, Carmen Stanganelli, Mirta Giordano, Romina Gamberale y Mercedes Borge, a los integrantes de Fundaleu, Carolina y Miguel Pavlovsky, que han conducido la investiga-

ción de factores de pronóstico y terapéuticos citados en esta reseña. En la institución a la que represento, CEMIC, al Dr. Dardo Riveros, quien me antecede en los proyectos institucionales sobre LLC. Al Grupo Argentino de Tratamiento de las Leucemias Agudas (GATLA) y particularmente a la Sociedad Argentina de Hematología, que ha brindado el soporte para desarrollar el Registro Argentino de Enfermedades Hematológicas (RAEH).

Declaración de conflictos de interés:

El autor declara que no posee conflictos de interés.

Bibliografía

1. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2004;163-183.
2. <http://www.registros-sah.com.ar/>
3. Amaru Lucana R, Peñaloza Imaña R, Miguez Vargas H, Torres Aldunate G, Quispe Soto T, Amaru Calzada A, Choque Carrillo G, Mamani J. Epidemiología de las leucemias en Bolivia. Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés. 1ra edición 2015, pp 17-19.
4. <http://www.ine.gob.bo/indice/visualizador.aspx?ah=PC20131.HTM>
5. <http://www.msal.gob.ar/images/stories/pdf/indicadores-basicos-2012.pdf>
6. Tamura K, Sawada H, Izumi Y, Fukuda T, Utsunomiya A, Ikeda S, Uike N, Tsukada J, Kawano F, Shibuya T, Gondo H, Okamura Suzumiya J; Kyushu Hematology Organization for Treatment (K-HOT) Study Group. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is rare, but the proportion of T-CLL is high in Japan. Eur J Haematol. 2001. Sep;67(3):152-7.
7. Isobe Y, Tomomatsu J, Tsukune Y, Tsukada N, Sasaki M, Sugimoto K, Komatsu N. Diagnostic problems among chronic lymphocytic leukemia and other indolent B-cell leukemias in a Japanese population. Intern Med. 2012;51(15):1977-81.

8. <http://www.worldlifeexpectancy.com/japan-life-expectancy>
9. <http://sah.org.ar/docs/Guia-Completa-2015.pdf> pp 465-497
10. Oscier D, Else M, Matutes E, Morilla R, Strefford JC, Catovsky D. The morphology of CLL revisited: the clinical significance of prolymphocytes and correlations with prognostic/molecular markers in the LRF CLL4 trial. *Br J Haematol*. 2016 May 6. doi: 10.1111/bjh.14132. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27151266.
11. Gogia A, Raina V, Gupta R, Gajendra S, Kumar L, Sharma A, Kumar R, Vishnubhatla S. Prognostic and predictive significance of smudge cell percentage on routine blood smear in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma. Leuk*. 2014 Dec;14(6):514-7.
12. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Geyer SM, LaPlant BR, Call TG, Jelinek DF, Zent CS, Kay NE. Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a universally available prognostic test. *Mayo Clin Proc*. 2007 Apr;82(4):449-53.
13. Shanafelt TD, Drake MT, Maurer MJ, Allmer C, Rabe KG, Slager SL, Weiner GJ, Call TG, Link BK, Zent CS, Kay NE, Hanson CA, Witzig TE, Cerhan JR. Vitamin D insufficiency and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Feb 3;117(5):1492-8.
14. Bezares R, Ledesma I, Solessi M, Frigeri E, Diaz A, Pantano J, Cambiasso S, Giordano M, Gamberale R, Servidio M, Iparragirre M, Calcagno M y Fideleff H. Análisis del valor de la vitamina D como factor pronóstico en Leucemia Linfática crónica. Posible implicancia terapéutica. *HEMATOLOGIA*. 2012 Mayo-Agosto;16(2):79-85.
15. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994 Oct;8(10):1640-5.
16. Pavlovsky C, Pardo L, Pavlovsky MA, Corrado C, Sapia S, Mountford P, Monreal M, Fernandez I, Milone G, Pavlovsky A, Juni M, Pavlovsky S. Is assessment of surface CD38 expression worthwhile as a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia patients? *Hematology*. 2008 Feb;13(1):24-7.
17. Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CR, Maekawa Y, Tamashiro N, Takao TT, Ritter EC, Rizzatti EG. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry. B Clin Cytom*. 2014 Mar;86(2):98-105.
18. Miao Y, Fan L, Wu YJ, Xia Y, Qiao C, Wang Y, Wang L, Hong M, Zhu HY, Xu W, Li JY. Low expression of CD200 predicts shorter time-to-treatment in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016 Mar 22;7(12):13551-62.
19. Chena C, Arrossagaray G, Scolnik M, Palacios MF, Slavutsky I. Interphase cytogenetic analysis in Argentinean B-cell chronic lymphocytic leukemia patients: association of trisomy 12 and del(13q14). *Cancer Genet Cytogenet*. 2003 Oct 15;146(2):154-60.
20. Travella A, Ripollés L, Aventin A, Rodríguez A, Bezares RF, Caballín MR, Slavutsky I. Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia. Cytogenetic and FISH analysis. *Hematol Oncol*. 2013 Jun;31(2):79-87.
21. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, Langerbeins P, von Tresckow J, Engelke A, Maurer C, Kovacs G, Herling M, Tausch E, Kreuzer KA, Eichhorst B, Böttcher S, Seymour JF, Ghia P, Marlton P, Kneba M, Wendtner CM, Döhner H, Stilgenbauer S, Hallek M. 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.
22. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone JA, Orchard JA, Hamblin TJ. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical

- cal stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*. 2002 Aug 15;100(4):1177-84.
23. Rodriguez JM, Elias F, Montaner A, Flo J, Lopez RA, Zorzopulos J, Franco RJ, Lenial SP, Lopez Sal6n M, Pirpignani ML, Solimano J, Garay G, Riveros D, Fernandez J, Cacchione R, Dupont J. Oligonucleotide IMT504 induces an immunogenic phenotype and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Medicina (Buenos Aires)*. 2006;66(1):9-16.
 24. Stanganelli C, Travella A, Bezares R, Slavutsky I. Immunoglobulin Gene Rearrangements and Mutational Status in Argentinian Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2013;13(4):447-57.
 25. Minutas GATLA a6os 1984/85.
 26. Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJ, Bezares RF, Pettitt AR, Hamblin T, Milligan DW, Child JA, Hamilton MS, Dearden CE, Smith AG, Bosanquet AG, Davis Z, Brito-Babapulle V, Else M, Wade R, Hillmen P; UK National Cancer Research Institute (NCRI) Haematological Oncology Clinical Studies Group; NCRI Chronic Lymphocytic Leukaemia Working Group. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007 Jul 21;370(9583):230-9.
 27. Bezares RF, Stemelin G, Diaz A, Argentieri D, Zubiaur EL, Garay G, Bartomioli M, Rysler R, Milone G. Multicenter study of subcutaneous alemtuzumab administered at reduced dose in patients with fludarabine-relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: final analysis. *Leuk Lymphoma*. 2011 Oct;52(10):1936-41.
 28. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al; International Group of Investigators; German Chronic Lymphocytic Leukaemia Study Group. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1164-1174.
 29. Riveros D, Bezares R, Stemmelin G, Milone G, Kusminsky G, Cerutti I, Pantano J, Garcia I. Results of a phase III trials of fludarabine, cyclophosphamide and Rituximab in previously untreated patients (P) with chronic lymphocytic leukaemia. *Annals of Oncology*. 2011 Junio;22(Sup 4):243.
 30. Fraser G, Silva RS, Grosicki S, Pristupa A, Janssens A, Mayer J, Bartlett NL, Dillhuydy MS, Pylypenko H, Loscertales J, Avigdor A, Rule S, Villa D, Samoilova O, Panagiotidis P, Goy A, Mato A, Pavlovsky MA, Karlsson C, Mahler M, Salman M, Sun S, Phelps C, Balasubramanian S, Howes A, Hallek M; HELIOS investigators. Ibrutinib combined with bendamustine and rituximab compared with placebo, bendamustine, and rituximab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma (HELIOS): a randomised, double-blind, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2016 Feb;17(2):200-11.
 31. Gamberale R, Geffner J, Arrosagaray G, Scolnik M, Salamone G, Trevani A, Vermeulen M, Giordano M. Non-malignant leukocytes delay spontaneous B-CLL cell apoptosis. *Leukemia*, 2001;15(12):1860-1867.
 32. Croci DO, Morande PE, Dergan-Dylon S, Borge M, Toscano MA, Stupirski JC, Bezares RF, Avalos JS, Narbaitz M, Gamberale R, Rabinovich GA, Giordano M. Nurse-like cells control the activity of chronic lymphocytic leukemia B cells via galectin-1. *Leukemia*. 2013;27(6):1413-1416.
 33. Borge M, Nannini PR, Morande PE, Jancic C, Bistmans A, Bezares RF, Giordano M, Gamberale R. CXCL12 is a costimulator for CD4+ T cell activation and proliferation in chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;62(1):113-124.
 34. Borge M, Remes Lenicov F, Nannini PR, de los Rios Alicandu MM, Podaza E, Ceballos A, Fernandez Grecco H, Cabrejo M, Bezares RF, Morande PE, Oppezzo P, Giordano

- M, Gamberale R . The expression of sphingosine-1 phosphate receptor-1 in chronic lymphocytic leukemia cells is impaired by tumor microenvironmental signals and enhanced by piceatannol and R406. *J Immunol.* 2014;193(6):3165-3174.
35. Borge M, Belén Almejún M, Podaza E, Colado A, Fernández Grecco H, Cabrejo M, Bezares RF, Giordano M, Gamberale R. Ibrutinib impairs the phagocytosis of rituximab-coated leukemic cells from chronic lymphocytic leukemia patients by human macrophages. *Haematologica.* 2015 Apr;100(4):e140-2.
36. X. Pavlovsky C, Fernández I, Pavlovsky M, Galeano A, Sackmann F, Intile D, Pavlovsky A. Abbreviated Regimen with 4 Cycles of Fludarabine, Cyclophosphamide and Rituximab (FCR) in Physically Fit Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Who Achieve Early Complete Remission with Undetectable Minimal Residual Disease: Safety and Efficacy Follow-up Results of a Single Center Experience. *American Society of Hematology.* Orlando 2015. Meeting abstract #1739
37. Pavlovsky M, Mela Osorio M, Riveros D, Pose Cabarcos J, Perinotto G, Ardaiz M, Bezares R, Pavlovsky C. Experiencia Argentina de Ibrutinib Monoterapia en Leucemia Linfática Crónica Recaída/Refractaria. *Congreso Sociedad Argentina de Hematología 2015,* Abstract #8153