

TESI DOCTORAL

Contribució de la citogenètica molecular i les tècniques d'estimulació i separació cel·lular a l'estudi de les neoplàsies hematològiques limfoides d'origen B

Memòria presentada per **Jana Sánchez García**
per assolir el grau de Doctor en Biologia per la
Universitat Autònoma de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció de la
Dra. Anna Aventín Artisan i la **Dra. M^a Dolors Coll Sandiumenge**
del Servei de Laboratori d'Hematologia de l'Hospital de Sant Pau de Barcelona
i del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la
Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. Anna Aventín Artisan

Dra. M^aDolors Coll Sandiumenge

Jana Sánchez García

Programa de Doctorat en Biologia Cel·lular
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona
Bellaterra, 2013

Abreviacions	9
1. INTRODUCCIÓ	
1.1. Hematopoesi	13
1.1.1. Limfopoesi	14
1.1.1.1. Estructura del gangli limfàtic	16
1.1.1.2. Formació de les immunoglobulines	16
1.1.1.3. Formació del limfòcit B	19
1.1.1.4. Formació del limfòcit T i cèl·lules NK	22
1.2. Cicle cel·lular i apoptosi	22
1.2.1. Mecanismes d'oncogènesi	23
1.3. Tècniques citogenètiques per l'estudi de les neoplàsies hematològiques	24
1.3.1. Citogenètica convencional	24
1.3.2. Citogenètica molecular	25
1.3.2.1. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent	25
1.3.3. Tècniques de separació cel·lular	27
1.3.3.1. Separació de cèl·lules mononuclears per gradient de densitat	27
1.3.3.2. Separació immunomagnètica de cèl·lules plasmàtiques amb partícules MACS	28
1.4. Neoplàsies hematològiques limfoides d'origen B	29
1.4.1. Classificació	29
1.4.2. LEUCÈMIA LIMFOBLÀSTICA AGUDA B	31
1.4.2.1. Classificació	31
1.4.2.2. Epidemiologia	31
1.4.2.3. Etiologia	32
1.4.2.4. Manifestacions clíniques	32
1.4.2.5. Immunofenotip	33
1.4.2.6. Alteracions citogenètiques	33
1.4.2.7. Altres canvis gènics i epigenètics	43
1.4.2.8. Anomalies cromosòmiques i pronòstic	44
1.4.3. LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA B	45
1.4.3.1. Epidemiologia	45
1.4.3.2. Etiologia	46
1.4.3.3. Manifestacions clíniques	47
1.4.3.4. Origen del limfòcit B patològic i estat mutacional <i>IGHV</i>	47
1.4.3.5. Estadiatge	49
1.4.3.6. Immunofenotip	49
1.4.3.7. Estudi citogenètic	50
1.4.3.7.1. Tècniques citogenètiques	50
1.4.3.7.1.1. Citogenètica convencional	51
1.4.3.7.1.2. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent interfàsica	52
1.4.3.7.2. Alteracions cromosòmiques	53
1.4.3.7.2.1. Deleció 13q14	53
1.4.3.7.2.2. Trisomia 12	57
1.4.3.7.2.3. Deleció 11q23(<i>ATM</i>)	57
1.4.3.7.2.4. Deleció 17p13(<i>P53</i>)	59
1.4.3.7.2.5. Translocacions	62

1.4.3.7.2.6. Evolució clonal	62
1.4.3.8. Factors pronòstic	63
1.4.4. NEOPLÀSIES DE CÈL·LULES PLASMÀTIQUES.	66
1.4.4.1. Gammapatia monoclonal de significat incert	66
1.4.4.2. Mieloma múltiple	67
1.4.4.2.1. Epidemiologia	67
1.4.4.2.2. Etiologia	68
1.4.4.2.3. Manifestacions clíniques	68
1.4.4.2.4. Immunofenotip	69
1.4.4.2.5. Mecanisme oncogènic	70
1.4.4.2.6. Alteracions citogenètiques	70
1.4.4.2.6.1. Hiperdiploïdia	72
1.4.4.2.6.2. Translocacions implicant al gen <i>IGH</i>	73
1.4.4.2.6.3. Deleció 13q/monosomia 13	76
1.4.4.2.6.4. Deleció 17p	77
1.4.4.2.6.5. Alteracions del cromosoma 1	77
1.4.4.2.7. Factors pronòstic	78
1.5. Hipòtesi	80
1.6. Objectius	82
2. MATERIAL I MÈTODES	
2.1. Pacients	85
2.2. Mètodes	85
2.3. Tècnica de citogenètica convencional	90
2.3.1. Cultiu cel·lular amb o sense estimulació	90
2.3.2. Bandes G i anàlisi de les preparacions	90
2.4. Tècniques de separació cel·lular	91
2.4.1. Separació de cèl·lules mononuclears per gradient de densitat	91
2.4.2. Separació immunomagnètica de cèl·lules plasmàtiques amb partícules MACS	91
2.5. Tècnica d'Hibridació <i>in situ</i> fluorescent	93
2.6. Anàlisi estadística	98
2.7. Solucions de treball i material inventariable.	98
3. RESULTATS	
3.1. LLA-B	103
3.1.1. Identificació de translocacions amb implicació del gen <i>IGH</i> no descrites prèviament: t(2;14)(q14.3;q22) i t(14;17)(q32;q21) (Estudi I)	103
3.2. LLC	109
3.2.1. Increment en la detecció d'alteracions cromosòmiques amb I-FISH en cultius estimulats amb TPA (Estudi II)	109
3.2.2. Increment del valor pronòstic de la I-FISH en cultius estimulats amb TPA respecte la I-FISH en cèl·lules mononuclears separades per gradient de densitat (Estudi III)	115
3.2.3. Deleció 13q14 (Estudi IV)	123
3.2.3.1. Pacients i tipus de deleció	123
3.2.3.2. Comprovació i estudi de la deleció en metafase	123
3.2.3.3. Relació entre la mida de la deleció i el nombre d'al·lels delecionats	124
3.2.3.4. Relació entre la mida de la deleció i associació a altres anomalies	124

3.2.3.5. Delecions submicroscòpiques 13q14 associades a translocació	125
3.2.3.5.1. Translocacions de 13q14 no descrites	125
3.3. NEOPLÀSIES DE CÈL·LULES PLASMÀTIQUES	129
3.3.1. Detecció d'alteracions cromosòmiques mitjançant I-FISH en cèl·lules plasmàtiques purificades vs. I-FISH en cultius de MO (Estudi V)	129
3.3.1.1. Pacients	129
3.3.1.2. Detecció d'alteracions i comparació dels resultats de I-FISH en CP vs. I-FISH en cultiu de MO	130
3.3.1.3. Detecció d'alteracions mitjançant I-FISH en cultiu de MO en relació al recompte de cèl·lules plasmàtiques	131
4. DISCUSSIÓ	
4.1. LLA-B	135
4.1.1. Identificació de noves translocacions amb implicació del gen <i>IGH</i>	135
4.2. LLC	137
4.2.1. Limitacions de l'anàlisi citogenètica convencional i importància de la FISH en interfase en la detecció d'alteracions	137
4.2.2. Detecció d'alteracions cromosòmiques i comparació dels resultats de la I-FISH en cultius estimulats amb TPA vs. I-FISH en cèl·lules mononucleades separades per gradient de densitat	138
4.2.3. Valoració del recompte de limfòcits absolut	141
4.2.4. Comparació de la SLT i la SG mitjançant I-FISH en cultius estimulats amb TPA i en cèl·lules mononucleades separades per gradient de densitat	142
4.2.5. Caracterització de les delecions 13q14	145
4.2.5.1. Obtenció de metafases en cultius de SP estimulats amb TPA	145
4.2.5.2. Mida de la delecio i la seva importància	146
4.2.5.3. Nombre d'al·lels deleccionats i la seva importància	147
4.2.5.4. Relació entre la mida i el nombre d'al·lels deleccionats i els mecanismes d'origen	147
4.2.5.5. Delecions 13q14 submicroscòpiques associades a translocació	148
4.3. NEOPLÀSIES DE CÈL·LULES PLASMÀTIQUES	150
4.3.1. Limitacions per a l'anàlisi citogenètica convencional i importància de l'estudi en interfase	150
4.3.2. Comparació de les tècniques de I-FISH en cultius de MO i en CP aïllades per a la detecció d'alteracions cromosòmiques	151
4.3.3. Relació entre el recompte de cèl·lules plasmàtiques i la detecció d'alteracions mitjançant I-FISH en cultiu de MO	153
5. CONCLUSIONS	
5.1. LLA-B	159
5.2. LLC	159
5.3. NEOPLÀSIES DE CÈL·LULES PLASMÀTIQUES	160
6. REFERÈNCIES	163

Aquesta tesi es presenta en forma de compendi d'articles a més d'altres resultats com els estudis IV i V.

Estudi I:

Novel IGH@ traslocations, t(2;14)(q14.3;q32) and t(14;17)(q32;q21), in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Aventín A, Sánchez J, Nomdedéu JF, Estany C, Forcada P, La Starza R, Mecucci C. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;185(1):57-9.

Estudi II:

Detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia increased by interphase fluorescence in situ hybridization in tetradecanoylphorbol acetate-stimulated peripheral blood cells. Sánchez J, Aventín A. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;175(1):57-60.

Estudi III:

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

Abreviacions

ADN	Àcid desoxirribonucleic
aLLC	Leucèmia limfàtica crònica atípica
AML1	<i>Acute myeloid leukemia 1</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
AYAs	<i>Adolescent young adults</i>
BCL9	<i>B-cell CLL/lymphoma 9</i>
BCR	Receptor de la cèl·lula B
C-	Cultiu sense estimulants
C+	Cultiu amb estimulants
CC	Citogenètica convencional
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	Lligand CD40
CEBP	<i>CCAAT enhancer-binding protein</i>
Igc	Immunoglobulina citoplasmàtica
CMGD	Cèl·lules mononuclears separades per gradient de densitat
CP	Cèl·lula plasmàtica
CRLF2	<i>Cytokine receptor-like factor 2</i>
DAPI	<i>4',6-diamino-2-phenylindole</i>
DLEU2	<i>Deleted in lymphocytic leukemia 2</i>
EBV	Virus Epstein-Barr
EGIL	<i>European Group for the Immunological Characterization of Leukemias</i>
EPOR	<i>Eritropoietin receptor</i>
FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent
GMSI	Gammapatia monoclonal de significat incert
HeH	Alta hiperdiploidia
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
I-FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent interfàsica
iAMP21	Amplificació intracromosòmica del cromosoma 21
ID4	<i>Inhibitor of DNA binding 4</i>
Ig	Immunoglobulina
IGH	Gen de la cadena pesada de les immunoglobulines
IGHV	Regió variable del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines

Abreviacions

IGL	Gen de la cadena lleugera de les immunoglobulines
IL	Interleuquina
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
iwCCL	<i>International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia</i>
PAR1	<i>Pseudoautosomic region 1</i>
LA	Leucèmia aguda
LAM	Leucèmia aguda mieloide
LBM	Limfocitosi B monoclonal
LLA	Leucèmia limfoblàstica aguda
LLC	Leucèmia limfàtica crònica
LMC	Leucèmia mieloide crònica
LPS	Lipopolisacàrid d' <i>E.Coli</i>
LSI	<i>Locus-specific identifier</i>
MACS	<i>Monoclonal antibody columns</i>
met-FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent en metafase
MGG	Tinció May-Grümwald Giemsa
miRNA	MicroRNA
MLL	<i>Mixed-lineage leukemia</i>
MM	Mieloma múltiple
MMA	Mieloma múltiple asimptomàtic o quiescent
MO	Medul·la òssia
PWM	<i>Pokeweed mitogen</i>
RB	Retinoblastoma
SG	Supervivència global
SLP	Síndrome limfoproliferativa
SLT	Supervivència lliure de tractament
SNC	Sistema nerviós central
SNP	<i>Single nucleotide polymorfism</i>
SP	Sang perifèrica
TP53	<i>Tumor protein 53</i> o P53
TPA	<i>12-O-tetradecanoilphorbol-13-acetate</i>
Tyr-K	Proteïna d'activitat tirosin cinasa
TA	Temperatura ambient
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZAP-70	<i>Z-chain associated protein 70kDa</i>

1. INTRODUCCIÓ

1.1. HEMATOPOESI

L'hematopoesi és el procés de formació, diferenciació i maduració dels diferents tipus cel·lulars que es troben a la sang perifèrica (SP). A l'embrió, les cèl·lules sanguínies més primitives deriven del sac vitel·lí i posteriorment, del fetge i melsa. Cap al naixement, la producció de cèl·lules sanguínies es situa a les cavitats de la medul·la òssia (MO) dels ossos llargs en formació, i cap a la pubertat l'activitat hematopoètica a aquestes zones disminueix, localitzant-se a l'esquelet de l'eix corporal. A l'adult el principal teixit hematopoètic productor de les cèl·lules sanguínies és la MO dels ossos plans: pelvis, esternó, costelles, vèrtebres i crani.

A partir d'una cèl·lula mare comú totipotent o *hematopoietic stem cell* (HSC) anomenada CFU-LM (unitat formadora de colònies limfo-mieloide) amb capacitat autoreplicativa i de diferenciació, s'originen les cèl·lules compromeses de llinatge mieloide CFU-GEMMeg (unitat formadora de colònies grànulo-monocítica, eritroide i megacariocítica) i de llinatge limfoide CFU-L (unitat formadora de limfòcits) (**figura 1**).

La proliferació i diferenciació de les HSC està regulada per citoquines ja siguin factors estimulants de colònies (CSF) o interleuquines (IL). El desenvolupament dels progenitors mieloides donarà lloc als granulòcits (neutròfils, basòfils i eosinòfils), monòcits, eritròcits i plaquetes a la SP, que un cop madures perdran la capacitat de replicació. Els monòcits es transformaran en macròfags als teixits. La maduració dels progenitors limfoides formarà els limfòcits B, T i les cèl·lules *natural killer* (NK) a la SP. Els limfòcits B activats es transformaran en cèl·lules plasmàtiques (CP) productores d'anticossos.

Les cèl·lules de la sèrie blanca o leucòcits desenvolupen funcions de defensa del sistema immunitari, així, els granulòcits participen en la defensa i processos inflamatoris, els monòcits i macròfags juguen papers d'immunovigilància, defensa i fagocitosi, i els limfòcits participen en la resposta immunitària cel·lular i humoral. La

sèrie vermella formada pels eritròcits està encarregada del transport d'O₂ i CO₂, i la sèrie plaquetar intervé en la trombosi i hemostàsia.

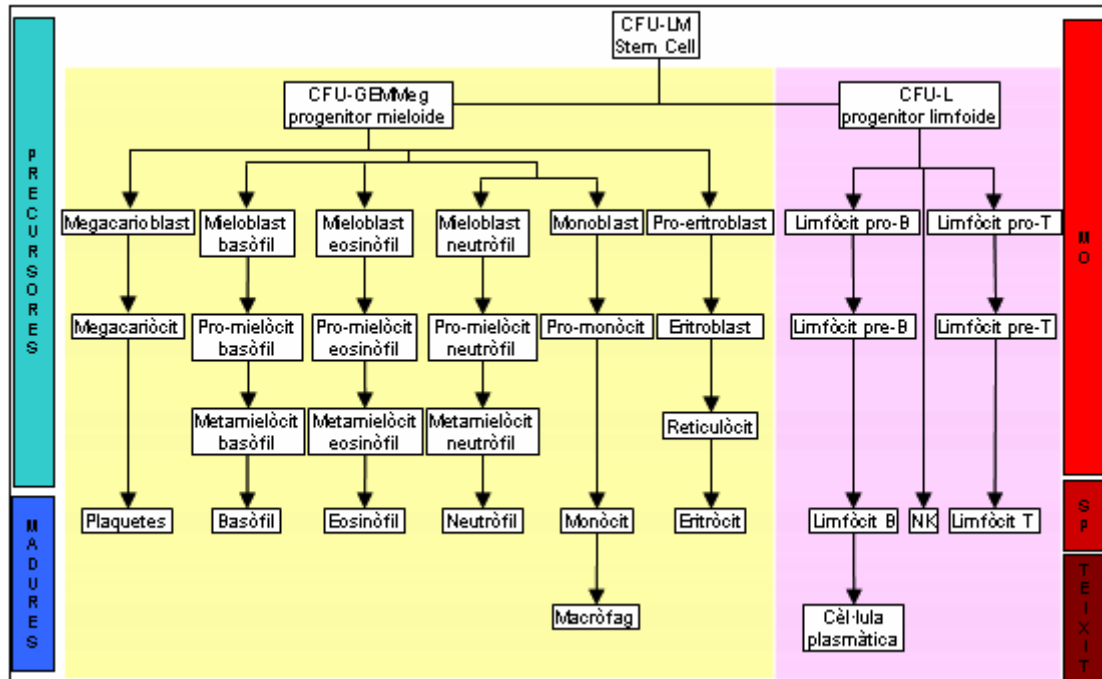


Figura 1. Esquema general de l'hematopoesi.

1.1.1. Limfopoesi

És el procés continu de formació dels limfòcits des del progenitor CFU-L fins a diferenciar-se en les cèl·lules madures circulants T, B i NK. El desenvolupament dels limfòcits T i B es produeix en una primera fase independent del contacte amb un antigen, i una segona fase antigen dependent (**figura 2**). A diferència de la resta de tipus cel·lulars, els limfòcits també poden proliferar fora de la MO, com als ganglis i altres teixits del sistema immunitari, com a resposta a una estimulació antigènica. Durant la limfopoesi el limfòcit B passarà pels estadis de limfòcit pro-B, pre-B, immadur, madur verge o naïve, activat, de memòria i CP productores d'immunoglobulines (Ig) (Parslow 2002; van Lochem *et al.* 2004; Delves i Roitt 2006; Sans-Sabrafen *et al.* 2006; Hoffbrand *et al.* 2010; per revisions: Chiorazzi *et al.* 2005; Chen-Kiang 2005; Walsh i Rosenquist 2005; Gonzalez *et al.* 2007; Zenz *et al.* 2010).

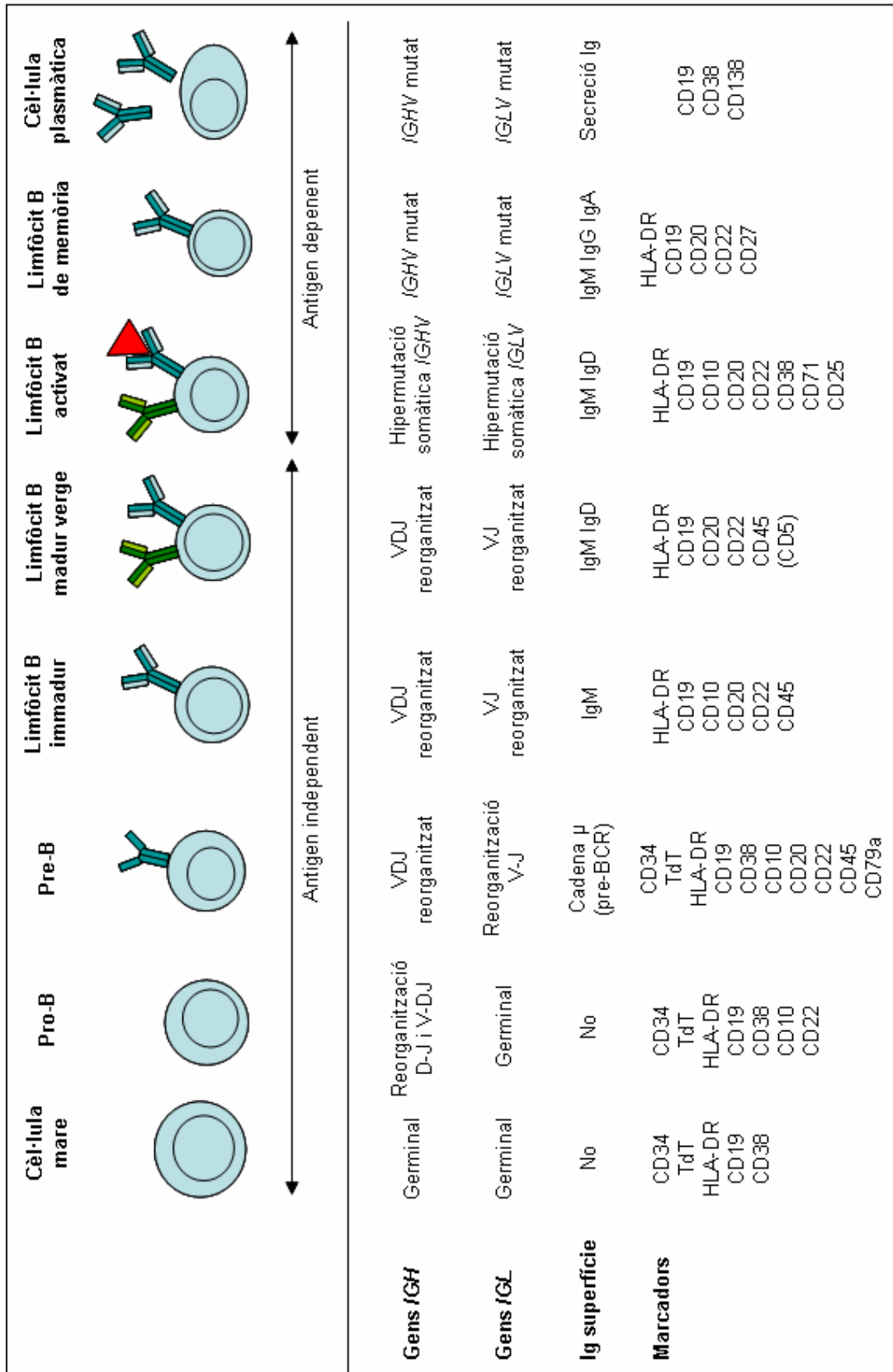


Figura 2. Procés de maduració del limfòcit B.

1.1.1.1. Estructura del gangli limfàtic

Part del procés de formació i maduració del limfòcit B succeeix al gangli limfàtic, des que el limfòcit madur verge (que ve de la MO a través de la SP) entra al gangli per ser activat fins l'estadi de limfòcit B de memòria. El gangli es compon per una càpsula que envolta la zona marginal, còrtex, paracòrtex i medul·la (**figura 3**) i es comunica mitjançant amb la resta del sistema mitjançant els vasos limfàtics aferent i eferent. El còrtex està format principalment per limfòcits B i el paracòrtex per limfòcits T. Entre el còrtex i el paracòrtex es localitzen els fol·licles primaris composts per un repertori de limfòcits B policlonals. El fol·licle primari es transforma en fol·licle secundari quan un dels limfòcits B és activat. El fol·licle secundari està constituït pel mantell (format principalment per limfòcits B de memòria) i el centre germinal, i aquest últim, per la zona fosca i la zona clara.

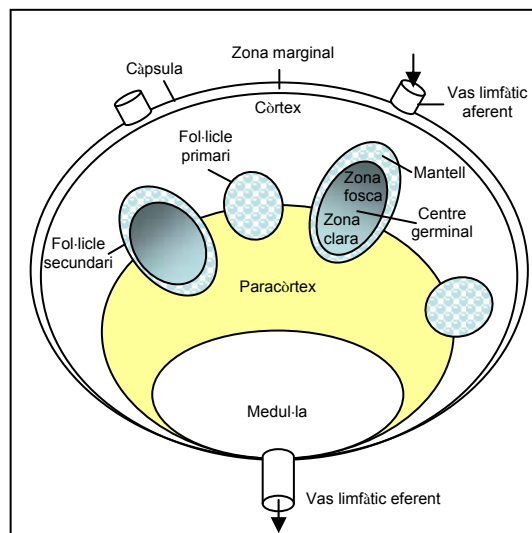


Figura 3. Estructura del gangli limfàtic

1.1.1.2. Formació de les immunoglobulines

La síntesi de les Ig o anticossos succeeix de forma paral·lela a la formació i maduració del limfòcit B.

Estructura de les Ig

Les Ig estan constituïdes per dues cadenes pesades (H, *heavy*) i dues cadenes lleugeres (L, *light*) (**figura 4**).

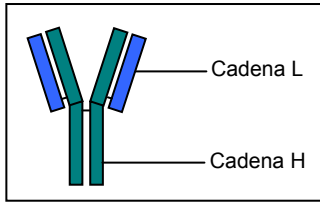


Figura 4. Estructura de les Ig.

Taula 1. Composició i estructura de les Ig.

Isotip	IgM	IgD	IgA	IgG	IgE
Cadenes H	μ	δ	α	γ	ϵ
Cadenes L	κ ó λ	κ ó λ	κ ó λ	κ ó λ	κ ó λ
Unitats bàsiques	5	1	1 / 2	1	1

Hi ha 5 tipus de cadenes H: μ , δ , α , γ , i ϵ , i 2 tipus de cadenes L: κ i λ . Les Ig poden presentar-se en diferents varietats conegudes com isotips en funció de les cadenes H amb que estiguin compostades. Aquestes són la IgM, IgD, IgA, IgG i IgE (taula 1). Un cop sintetitzades les Ig es secretaran en forma de monòmers, dímers o pentàmers.

Gens de les Ig

El gen codificant de la cadena H de les Ig (*IGH*) es troba a 14q32 i està estructurat en una regió variable i una constant. La regió variable es compon per 1-50 segments variables (V), 1-30 segments de diversitat (D) i 1-6 segments d'unió (J, *junction*). La regió constant (C) està formada per 9 segments anomenats μ , δ , γ_3 , γ_1 , α_1 , γ_2 , γ_4 , ϵ , α_2 (figura 5).

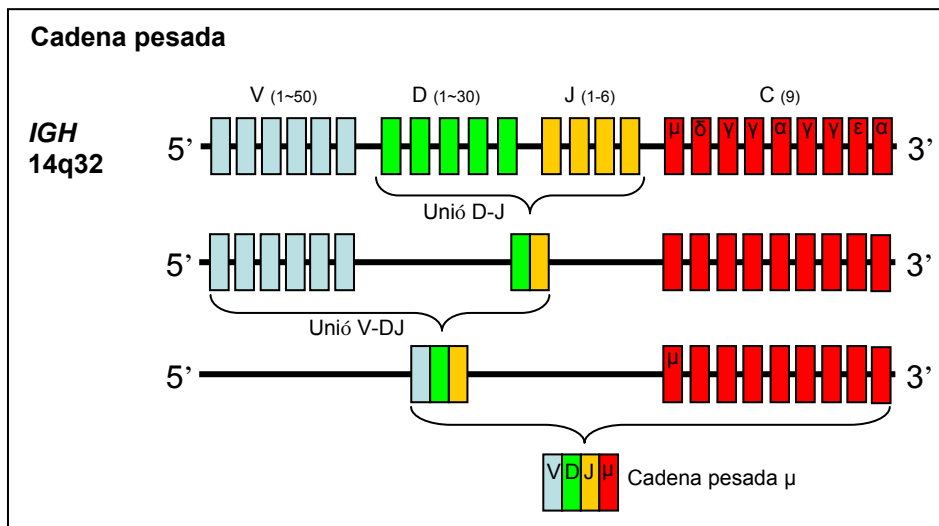


Figura 5. Estructura i reorganització dels gens de la cadena pesada de les Ig.

El gen que codifica la cadena lleugera κ (*IGL* κ) es troba a 2p12 i està format per 1-40 segments V, 1-5 segments J i 1 segment C (figura 6). El gen que codifica la cadena

lleugera λ (*IGL* λ) es troba a 22q11 i està format per 1-29 segments V i 1-4 *clusters* JC (figura 7).

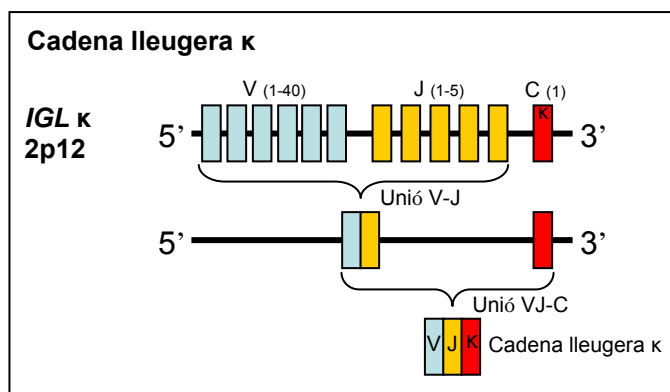


Figura 6. Estructura i reorganització del gen de la cadena lleugera κ de les Ig.

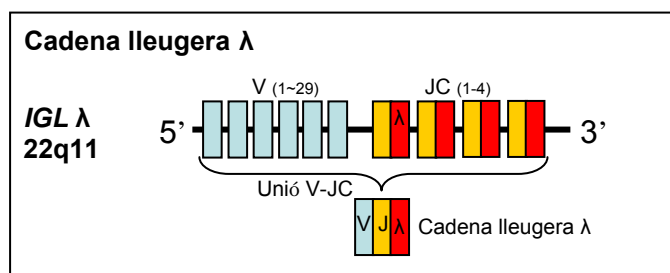


Figura 7. Estructura i reorganització del gen de la cadena lleugera λ de les Ig.

Reorganització dels gens de les Ig

És el procés normal de recombinació a l'atzar dels segments que componen els gens de les Ig, contribuint a la diversitat d'aquestes a reconèixer l'antigen.

La reorganització del gen *IGH* s'inicia en el limfòcit pro-B per la unió d'un segment D i un segment J mitjançant l'enzim desoxirribonucleotidil transferasa terminal (TdT) (figura 5). Els segments DJ ja reordenats s'uneixen després a un segment V. Els segments anomenats V1-69, V3-07, V3-23 i V4-34 són els que apareixen amb més freqüència. Finalment la unió amb un segment C (μ en aquest cas) serà determinant del tipus de Ig. En la traducció es sintetitzarà la cadena pesada μ .

El reordenament dels gens *IGL* s'inicia en el limfòcit pre-B i succeeix de forma similar a la reorganització del gen *IGH*. El gen de la cadena κ (figura 6) es reorganitza per la unió d'un segment V i un J, i posteriorment s'afegeix el segment constant κ . En la

traducció es sintetitza la cadena lleugera κ . El gen de la cadena λ (**figura 7**) es reordena per la unió d'un segment V a un dels *clusters* JC i es sintetitza la cadena lleugera λ . Primer es reordena el gen de la cadena κ i si la proteïna resultant no és funcional es reordena la cadena λ , en una proporció 2:1.

La unió de dues cadenes lleugeres κ o λ amb dues cadenes pesades μ formaran la IgM, primer anticòs que es sintetitza contra un antigen, i principal component del receptor de cèl·lules B (BCR) que es presenta a la superfície del limfòcit.

Hipermutació somàtica dels gens de les Ig

Durant la maduració del limfòcit al gangli els gens de les Ig patiran de forma natural un procés de mutacions puntuals en la regió V dels gens *IGH* (*IGHV*) i *IGL* anomenat hipermutació somàtica, variant l'afinitat del BCR per l'antigen. Es produeixen habitualment al centre germinal del fol·licle limfoide secundari com a conseqüència d'una activació limfòcit T-dependent, però sembla que l'activació del limfòcit B també pot ocórrer a la zona marginal del gangli de forma limfòcit T-independent, induït o no les hipermutacions per un procés desconegut (per revisions: Chiorazzi *et al.* 2005; Zenz *et al.* 2010). Aquestes mutacions es detecten comparant la seqüència de la regió V dels gens de les Ig dels limfòcits B del pacient amb els corresponents gens de la línia germinal d'una base de dades. Per exemple, una seqüència *IGHV* que divergeix en el 2% o més de la línia germinal es defineix com mutada, encara que altres *cut-off* han estat considerats (Krober *et al.* 2002).

1.1.1.3. Formació de limfòcit B

En aquest procés es troben els següents estadis (**figura 2**):

- **Limfòcit pro-B:** és el progenitor més immadur. Expressa els marcadors CD34, TdT, HLA-DR, CD19, CD38, CD10 i CD22. En aquest estadi la cèl·lula inicia la reorganització dels gens de les Ig.
- **Limfòcit pre-B:** aquest limfòcit ja té el gen *IGH* reordenat i es comencen a sintetitzar

les cadenes H de tipus μ que fan d'estructura prèvia al BCR anomenada pre-BCR. En aquest estadi es reordenen els gens de les cadenes lleugeres κ o λ . Aquesta cèl·lula encara expressa CD34, TdT, HLA-DR, CD19, CD38, CD10, CD22, a més d'incorporar CD20, CD45 i CD79a.

- **Limfòcit B immadur:** en aquest estadi la IgM se situa a la superfície del limfòcit formant part del BCR junt amb altres marcadors de superfície com CD79a i CD79b. El BCR és el responsable del reconeixement de l'antigen i activa la resposta immunològica humoral gràcies al domini intracel·lular que transmet senyals d'activació a altres Tyr-K. El limfòcit amb la IgM de superfície passa per un procés de selecció en el que serà eliminat si la IgM que produeix desencadena una resposta autoimmunitària a antigens del propi cos. Els limfòcits que superin aquesta etapa continuaran la seva maduració.

- **Limfòcit B madur verge o naïve:** comença a expressar IgD de superfície i migra des de la MO als òrgans limfàtics secundaris (ganglis limfàtics, teixit limfoide associat a mucosa (MALT) i melsa) a través de la SP. El limfòcit B entra al gangli pel vas aferent i es situa al còrtex a l'espera de ser activat pels limfòcits T del paracòrtex (**figura 3**). Els limfòcits verges que no s'activen moriran en dies. Aquest limfòcit expressa els marcadors CD19, CD20, CD22, CD45 i una petita població també CD5.

- **Limfòcit B activat:** el limfòcit madur verge en contactar amb l'antigen mitjançant l'ajuda del limfòcit T migra al fol·licle primari on hi ha limfòcits B policlonals en repòs, que reconeixen altres antigens. Aquí el limfòcit activat prolifera transformant el fol·licle primari en secundari, formant el centre germinal (**figura 8**). A la zona fosca el limfòcit – anomenat centroblast – pateix una transformació blàstica i expansió clonal que genera clons productors d'Ig amb la mateixa especificitat antigènica. En aquest estadi el centroblast pateix les hipermutacions somàtiques. En deixar de dividir-se, el limfòcit migra a la zona clara – anomenant-se centròcit – el qual competint per la unió a l'antigen, és seleccionat o eliminat per apoptosi si ha adquirit mutacions que facin disminuir l'afinitat per l'antigen. Aquells centròcits que incrementin l'afinitat sobreviuran

i contactaran amb els limfòcits T cooperadors mitjançant la interacció CD40 (del limfòcit B)-CD40L (del limfòcit T), fonamental per continuar la diferenciació dels limfòcits B. Els centròcits també poden patir un canvi d'isotip (*switch*) o canvi de tipus d'Ig per la recombinació de l'ADN amb els segments C α , γ , i ϵ , substituint la IgM o IgD per les IgG, IgA o IgE. Els que sobrevisquin esdevindran limfòcits B de memòria o precursors de CP i el centre germinal involucionarà.

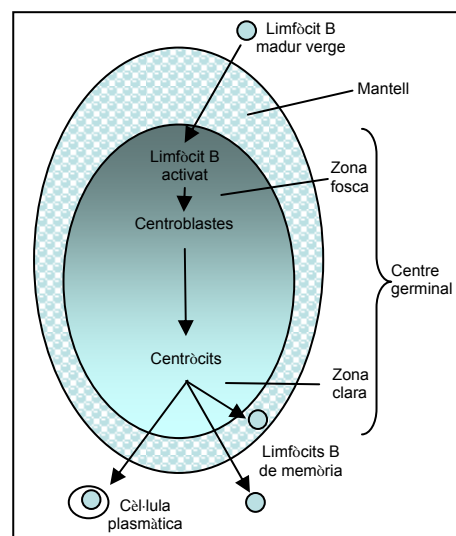


Figura 8. Maduració del limfòcit B al fol·licle secundari.

- **Limfòcits B de memòria:** resideixen principalment al mantell del fol·licle (**figures 7 i 8**) o circulen en estat de repòs G0 i poden desencadenar ràpidament una resposta immune secundària en vers el mateix antigen. Les cèl·lules d'aquest clon es convertiran en precursors de CP. Poden sobreviure al nostre cos durant anys i clàssicament són IgM+/IgD+,CD27+.

- **Cèl·lula plasmàtica:** les cèl·lules precursors de les CP tornaran a la MO finalitzant la maduració i transformant-se en CP especialitzades capaces de sintetitzar i secretar les Igs. La vida d'aquestes cèl·lules és de dies o setmanes i són CD19, CD38 i CD138 positives.

1.1.1.4. Formació del limfòcit T i cèl·lules NK

Les formes més immadures dels limfòcits T migren des de la MO al timus per madurar i proliferar alhora que van adquirint els marcadors de CD3, CD4/8, CD2, TCR (*T-cell receptor*) fins esdevenir immunocompetents. De forma similar als limfòcits B, la formació del TCR es produeix per una reorganització dels gens de les cadenes α i β ó γ i δ , però no expressen Ig de superfície. Els limfòcits T madurs verges capaços de reaccionar contra antigens del propi cos seran eliminats i els que hagin superat la selecció migraran cap a teixits limfoides perifèrics des de on circularan pel torrent sanguini. Quan contactin amb un antígen, el limfòcit T responsable de la immunitat cel·lular serà capaç de destruir-lo directament activant la via citotòxica, o indirectament activant als limfòcits B. Part d'aquests limfòcits passaran a formar part dels limfòcits T de memòria que poden viure durant anys. A la SP representen entre el 65-75% dels limfòcits; d'aquests el 70% són limfòcits T cooperadors (CD4+) i el 25% limfòcits T citotòxics (CD8+).

Les cèl·lules NK representen una petita proporció a la SP i mostren una activitat destructora en front cèl·lules infectades per virus i cèl·lules canceroses. Deriven d'un progenitor comú del limfòcit T i a diferència d'aquests, no pateixen cap reorganització de gens dels receptors. Són CD3 negatives i presenten els marcadors CD56 i CD16.

1.2. CICLE CEL·LULAR I APOPTOSI

El cicle cel·lular està sota control d'una sèrie de mecanismes que si s'alteren poden desenvolupar una neoplàsia. La maquinària molecular que controla la progressió del cicle cel·lular depèn de les ciclines i les cinases dependents de ciclines (CDK) (**figura 9**). Existeixen 4 punts de control al llarg del cicle: el punt de restricció (R) a G1 i els de control al final de G1, S i G2. El cicle s'inicia a G1 a través de senyals de proliferació que donen lloc a la formació del complex ciclina D-CDK4/6. En aquesta etapa, el punt R és decisiu i està controlat per la proteïna supressora de tumors RB (Retinoblastoma)

que fosforil·lada, permet que el cicle progressi. La formació dels complexos ciclina E-CDK2, ciclina A-CDK2 i ciclina B-CDK1 faran que el cicle continui avançant fins a mitosi (M). Els senyals antimitòtics, com el dany en l'ADN, inhibeixen la formació dels complexos ciclina-CDK a través de les proteïnes P53 i P21, aturant el cicle per tal de reparar l'ADN, induir l'apoptosi o entrar en estat de quiescència G0 (per revisió Malumbres i Barbacid 2009).

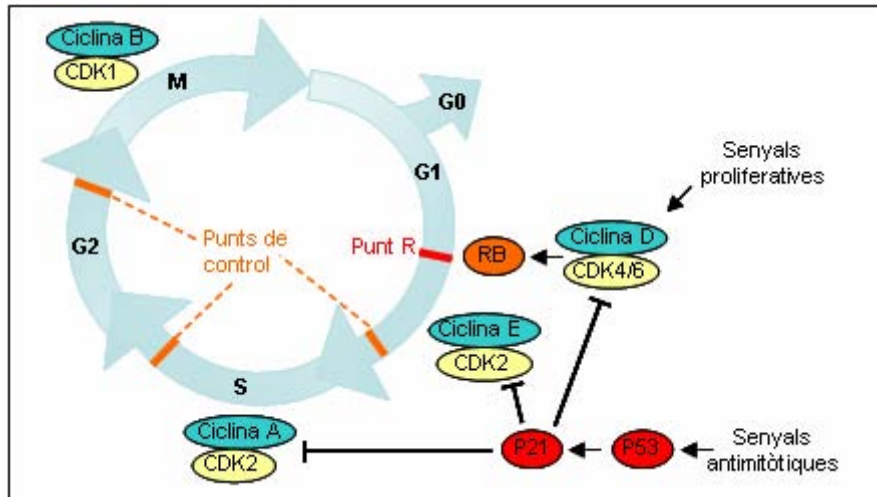


Figura 9. Esquema del cicle cel·lular i mecanismes reguladors.

1.2.1. Mecanismes d'oncogènesi

L'activació d'un protooncogèn (oncogen) i la inactivació d'un gen supressor de tumors són els mecanismes clàssics oncogènics. En condicions normals, els protooncogens estimulen la proliferació cel·lular mentre que els gens supressors de tumors la inhibeixen. Les alteracions gèniques involucrant aquests gens contribueixen a la transformació neoplàsica desregulant el cicle cel·lular, modificant la capacitat d'autorenovació, escapant als controls normals de proliferació, bloquejant la diferenciació i evadint-se de l'apoptosi (per revisions: Willis i Dyer 2000; Sandberg i Meloni-Ehrig 2010; Hanahan i Weinberg 2011).

Els mecanismes d'activació dels oncogens són:

- la juxtaposició del promotor o *enhancer* d'un gen a un protooncogèn, habitualment per translocació, donant sobreexpressió de la proteïna codificada pel protooncogèn.
- l'amplificació d'un oncogen, per exemple *C-MYC*, sobreexpresant-se.

- la fusió de dos oncogens que donen lloc la síntesi d'una proteïna quimèrica de funció alterada degut a translocacions, inversions o insercions. Aquest mecanisme freqüentment activa proteïnes Tyr-K, importants reguladores de les vies de senyalització, que també es poden activar per mutacions puntuals, delecions o amplificacions.

Els mecanismes d'inactivació dels gens supressors de tumors són:

- les aneuploïdies, delecions o mutacions del gen que impliquin a tots dos al·lels, desregulant el cicle cel·lular i l'apoptosi com per exemple les delecions dels gens *TP53* (17p13) o *RB* (13q14) en molts tipus de càncers.

Altres mecanismes oncogènics descrits recentment són els epigenètics (Ruvkun 2001; per revisions: Bartel 2004; Esteller 2011) que consisteixen en la modificació de l'ADN mitjançant metilacions, acetilacions o microRNAs (petits fragments de RNA d'uns 22 nucleòtids en *loop*) que fan inaccessible el promotor d'un gen, inhibint la transcripció. Normalment afecta a gens supressors de tumors.

1.3. TÈCNiques CITOGENÈTIQUES PER A L'ESTUDI DE LES NEOPLÀSIES HEMATOLÒGIQUES

1.3.1. CITOGENÈTICA CONVENCIONAL

La citogenètica convencional (CC) i el desenvolupament de les tècniques de bandeig cromosòmic cap a finals dels anys 60, van permetre una identificació més acurada dels cromosomes (Caspersson *et al.* 1968). Existeixen diverses tècniques de bandeig cromosòmic com les bandes G (amb tinció de Wright o Giemsa) i les bandes R (amb giemsa o taronja d'acridina). L'*International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) (Shaffer *et al.* 2009) proposa unes pautes estandarditzades que permeten la descripció dels cromosomes i les seves alteracions. El principal avantatge de la CC és la valoració global de tot el genoma a nivell microscòpic. La necessitat de cèl·lules en metafase i de personal altament preparat són les principals limitacions. A

més, la mala qualitat cromosòmica, les alteracions submicroscòpiques o críptiques per sota la resolució de la CC, o la presència de metafases que no formen part de la clona tumoral són altres punts importants a tenir en compte en el diagnòstic citogenètic (Stockero *et al.* 2006; per revisions: Harrison 2009; Sandberg i Meloni-Ehrig 2010).

1.3.2. CITOGENÈTICA MOLECULAR

1.3.2.1. Hibridació *in situ* fluorescent

La hibridació *in situ* fluorescent (FISH) es va desenvolupar en els anys 80 com a modificació de la hibridació *in situ* (HIS) amb isòtops radioactius, substituint-los per fluorocroms (Pinkel *et al.* 1986) i es basa en la complementarietat de la doble cadena d'ADN. La tècnica utilitza fragments d'ADN marcats amb fluorocroms (sonda) que hibriden específicament en la regió complementària a l'ADN de la mostra, tant en metafase com en interfase, sense la necessitat de cèl·lules en divisió (Cremer *et al.* 1988). L'aplicabilitat de la tècnica en la interfase (I-FISH) o citogenètica interfàsica ha facilitat l'estudi citogenètic de determinades neoplàsies amb dificultats en l'obtenció de metafases, com en el cas de la leucèmia limfàtica crònica (LLC) o el mieloma múltiple (MM). Les sondes poden estar marcades indirectament a través de nucleòtids conjugats a biotina o digoxigenina que es detecten mitjançant anticossos marcats amb el fluorocrom; però a l'actualitat hi ha disponibles un gran ventall de sondes comercials de marcatge directe on els nucleòtids estan units directament a un fluorocrom (per revisió Tsuchiya 2011). Els tipus de sondes es poden classificar segons les regions o seqüències que localitzen (**figura 10**). Les sondes telomèriques hibriden en els telòmers i estan constituïdes per seqüències curtes altament repetitives. De forma similar, les sondes centromèriques consisteixen en seqüències específiques repetitives o ADN satèl·lit present en els centròmers, i són útils per detectar alteracions numèriques en interfase i metafase. Les sondes locus-específic són seqüències úniques d'ADN específiques d'un locus. Es fabriquen inserint ADN genòmic d'unes

100-300Kb dins de cromosomes bacterians i són especialment útils en la detecció de reordenaments estructurals (translocacions) o canvis en el nombre de còpies (deleccions, amplificacions) del locus, en interfase i metafase. Dins aquestes sondes existeixen les de tipus *dual-fusion* les quals marquen dos locus amb diferent color que en cas de trobar-se adjacents per una translocació, mostren una senyal de fusió; i les *break-apart* on un locus propens a reordenar-se està marcat amb dos fluorocroms diferents a cada banda del punt de trencament formant una senyal de fusió que en reordenar-se, se separa mostrant dues senyals independents. Les sondes de pintat cromosòmic o *painting* marquen la totalitat del cromosoma, i s'utilitzen per la confirmació d'anomalies estructurals i numèriques o en la identificació de cromosomes marcadors d'origen desconegut, però només són aplicables en metafase (Gozzetti i Le Beau 2000; per revisions: Kearney 2001; Tsuchiya 2011).

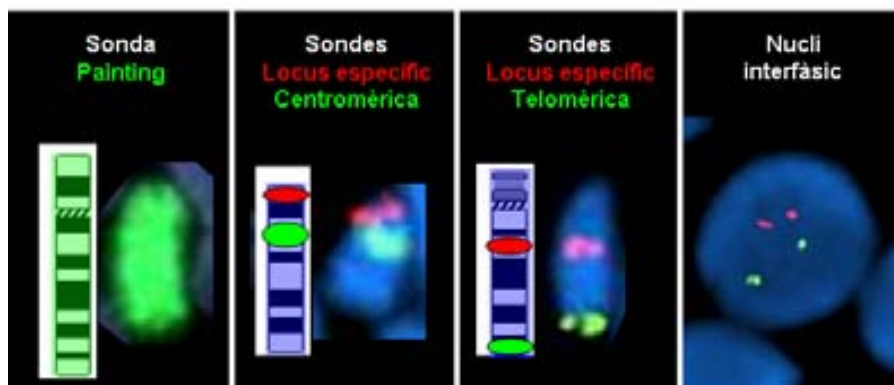


Figura 10. Tipus de sondes observades en metafase i interfase mostrant patrons normals.

Els principals avantatges de la FISH respecte la CC són poder realitzar l'anàlisi en interfase d'un gran nombre de cèl·lules, de forma relativament ràpida, i permet la identificació de petites poblacions tumorals sense requerir de personal tan especialitzat com en la CC. A més, és capaç d'identificar alteracions en metafases de baixa qualitat cromosòmica, com detectar anomalies submicroscòpiques o críptiques no identificables per CC. També dona la possibilitat de fer servir les mateixes preparacions utilitzades en la CC per fer la FISH, així com utilitzar diferents sondes de forma seqüencial sobre les mateixes metafases.

La principal limitació de la FISH és que únicament avalua la regió o regions seleccionades per estudiar en base a les sondes disponibles i que l'elecció de les mateixes depèn de informació prèvia o sospita diagnòstica. A més, només algunes anomalies poden ser estudiades en un mateix experiment, deixant sense avaluar gran part del cariotip (Duncan *et al.* 1993; Wang *et al.* 1995; Dierlamm *et al.* 1996; Gozzetti i Le Beau 2000; Nordgren 2003; Stockero *et al.* 2006). La resolució de la FISH és diferent en interfase o en metafase; la interfase té una resolució de 50kb-1Mb i la metafase de 1-3 Mb (Wilkinson 1998). Donada la importància de la citogenètica per al diagnòstic i tractament de les neoplàsies hematològiques i degut a les seves limitacions, es fa necessària la combinació de diverses tècniques.

1.3.3. TÈCNiques DE SEPARACIÓ CEL·LULAR

Les tècniques de separació cel·lular són metodologies de suport en nombrosos camps científics. Encara que no són específiques en citogenètica, són de gran utilitat per tal d'enriquir la població cel·lular a estudiar.

1.3.3.1. Separació de cèl·lules mononuclears per gradient de densitat

La tècnica de separació de cèl·lules mononuclears per gradient de densitat (CMGD) es va descriure cap a finals dels anys 60 per tal d'aïllar les cèl·lules mononuclears de la SP o MO (Boyum 1968). Aquest procediment utilitza una barreja de polisacàrids i medi de contrast a una densitat de 1,077 g/mL que facilita l'agregació dels eritròcits i granulòcits que per centrifugació sedimenten i, a la interfase entre el plasma i el medi de separació, els limfòcits i altres cèl·lules mononuclears queden en suspensió formant una capa.

1.3.3.2. Separació immunomagnètica de cèl·lules plasmàtiques amb partícules MACS

La tecnologia de separació immunomagnètica MACS® (*monoclonal antibody columns*) va ser desenvolupada als anys 90 per Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). S'utilitza per aïllar tipus cel·lulars rars o poc representats en una mostra heterogènia, com per exemple les CP de la MO. La tècnica es basa en la selecció positiva de les cèl·lules CD138+, marcador específic de CP normals i malignes. El procediment consta d'un marcatge immunomagnètic, separació per columnes i recuperació de CP (figura 11).

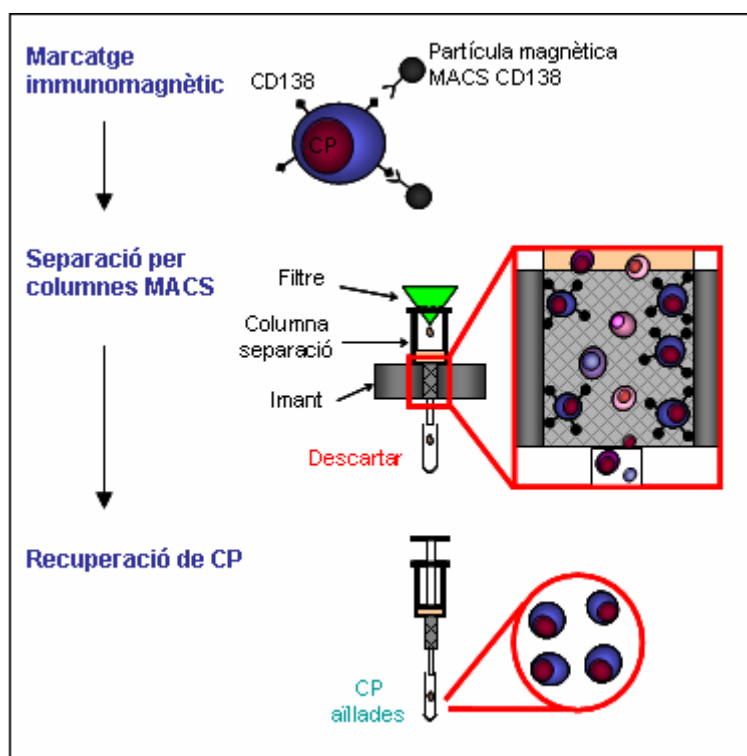


Figura 11. Separació immunomagnètica de CP mitjançant MACS.

El marcatge es realitza amb partícules magnètiques *MACS CD138 MicroBeads*, que estan conjugades a un anticòs anti-CD138 monoclonal de ratolí que s'uneixen al marcador CD138 o Syndecan-1. La separació de CP es realitza amb columnes de separació *MS Columns MACS* amb una capacitat per 10^6 de cèl·lules marcades i fins a 200×10^6 cèl·lules totals. Les columnes contenen una matriu que genera un fort camp magnètic quan s'insereixen dins el imant *MiniMACS Separator*. Les cèl·lules marcades

CD138+ es queden retingudes a la columna mentre que les que no ho estan s'elueixen i poden ser descartades. Al treure la columna del camp magnètic les cèl·lules que estaven retingudes poden ser eluïdes, obtenint les CP. La taxa d'enriquiment es situa entre 50-1.000 vegades, i fins a 10.000 si la separació es realitza amb una segona columna.

1.4. NEOPLÀSIES HEMATOLÒGIQUES LIMFOIDES D'ORIGEN B

Les neoplàsies hematològiques limfoides d'origen B són un grup heterogeni d'hemopaties malignes caracteritzades per la proliferació clonal de cèl·lules de llinatge limfoide B que poden estar afectades en diferents estadis maduratius.

Aquestes neoplàsies es poden diferenciar en dos grups: les proliferacions de precursors limfoides B o leucèmies agudes (LA), i les proliferacions de cèl·lules B madures també anomenades síndromes limfoproliferatives (SLP) cròniques. Existeixen dues formes de presentació: leucèmia i limfoma, leucèmia quan la proliferació i acumulació de cèl·lules és a la MO i/o SP, i limfoma quan la neoplàsia es troba restringida a una massa i sense, o gairebé gens, afectació de la MO o SP. L'hemograma d'un individu sà presenta un recompte de limfòcits de $1,5-4,0 \times 10^9/L$ representant el 25-35% dels leucòcits totals. El 10-20% dels limfòcits de la SP són limfòcits B.

1.4.1 Classificació

La classificació de les neoplàsies limfoides ha evolucionat al llarg de les últimes dècades fins a la classificació de la *World Health Organization* (WHO) (WHO 2008) basada en criteris morfològics, immunofenotípics, genètics i clínics, de la que es va publicar la primera edició l'any 1999 (Harris *et al.* 1999). La classificació de la WHO (2008) de les neoplàsies limfoides d'origen B és la següent:

Neoplàsies de precursors limfoides B

- Leucèmia/limfoma limfoblàstica B, sense característiques específiques
- Leucèmia/limfoma limfoblàstica B, amb anomalies genètiques recurrents
 - Leucèmia/limfoma amb t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*
 - Leucèmia/limfoma amb t(v;11q23); *MLL* reordenat
 - Leucèmia/limfoma amb t(12;21)(p13;q22); *TEL-AML1(ETV6-RUNX1)*
 - Leucèmia/limfoma amb hiperdiploïdies
 - Leucèmia/limfoma amb hipodiploïdies
 - Leucèmia/limfoma amb t(1;19)(q23;p13.3); *E2A-PBX1(TCF3-PBX1)*
 - Leucèmia/limfoma amb t(5;14)(q31;q32); *IL3-IGH*

Neoplàsies de cèl·lules B madures

- Leucèmia limfàtica crònica/Linfoma de limfòcits petits
- Leucèmia prolimfocítica B
- Linfoma esplènic de la zona marginal
- Leucèmia de limfòcits vellosos
- Leucèmia/limfoma esplènic
 - limfoma esplènic de cèl·lules B petites amb infiltració difusa de la polpa vermella
 - Leucèmia de limfòcits vellosos variant
- Linfoma limfoplasmacític
- Patologia de cadenes pesades
- Neoplàsies de cèl·lules plasmàtiques
 - Gammapatia monoclonal de significat incert
 - Mieloma de cèl·lules plasmàtiques
 - Plasmocitoma solitari ossi
 - Plasmocitoma extraossi
 - Patologies de dipòsits d'immunoglobulines monoclonals
- Linfoma de la zona marginal extranodal MALT (teixit limfoide associat a mucosa)
- Linfoma de la zona marginal nodal
- Linfoma fol·licular
- Linfoma del centre fol·licular primari cutani
- Linfoma de cèl·lules del mantell
- Linfoma B difús de cèl·lula gran (LBDCG), sense especificar
 - LBDCG ric en cèl·lules T/histiòcits
 - LBDCG primari del sistema nerviós central
 - LBDCG primari cutani (*leg type*)
 - LBDCG EBV positiu del pacient d'edat avançada
- LBDCG associat a inflamació crònica
- Granulomatosi limfomatoide
- Linfoma B de cèl·lula gran primari del mediastí (timus)
- Linfoma B de cèl·lula gran intravascular
- Linfoma B de cèl·lula gran ALK positiu
- Linfoma plasmablàstic
- Linfoma B de cèl·lula gran HHV8 associat malaltia de Castleman
- Linfoma primari d'efusions
- Linfoma de Burkitt
- Linfoma B, inclassificable, amb trets entre LBDCG i limfoma Burkitt
- Linfoma B, inclassificable, amb trets entre LBDCG i limfoma de Hodgkin clàssic

Entre aquestes patologies, el present treball es centrarà en la leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) B, la LLC i les neoplàsies de CP.

1.4.2. LEUCÈMIA LIMFOBLÀSTICA AGUDA B

La LLA-B és una proliferació clonal de precursors dels limfòcits B. Tant la LLA com el limfoma limfoblàstic són considerats una mateixa entitat amb característiques morfològiques i genètiques iguals però amb diferent afectació de la MO i SP. Les recomanacions de la WHO estableixen el criteri de leucèmia aguda (LA) quan es troben >20% de blastes en MO.

1.4.2.1. Classificació

Clàssicament, LLA ha estat categoritzada segons la FAB (*French-American-British cooperative group*) en 3 tipus L1, L2 i L3, en base a la morfologia cel·lular (Bennett *et al.* 1976). Actualment les dades genètiques han donat identitat a la malaltia donant lloc a la classificació WHO, 2008 (apartat 1.4.1).

1.4.2.2. Epidemiologia

La LLA és principalment una neoplàsia hematològica infantil però també es presenta en adults. El 75% de les LLA es diagnostiquen en nens de <6 anys, amb una incidència de 1-4,75/100.000 persones l'any, representant el 80% de les LA, éssent més freqüent entre els 3 i 5 anys. A l'adult (>15 anys) és de distribució bimodal; més freqüent entre els 15-19 anys i a partir dels 60 anys i representa el 15-25% de totes les LA. El 80-85% de les LLA són d'origen B, a diferència del limfoma limfoblàstic on els de cèl·lules B només representen un 10% (WHO 2008). La distribució per sexes és 1,2:1 (home:dona).

1.4.2.3. Etiologia

Es desconeix el desencadenant de la LLA però, factors genètics com el síndrome de Down augmenten la predisposició a patir-la. L'exposició a mutàgens durant la vida fetal podria ser un iniciador, així com l'exposició a inhibidors de la topoisomerasa II que poden desenvolupar una LLA amb reordenament del gen *MLL* (per revisió Pui *et al.* 2004). L'adquisició de reordenaments gènics específics *in utero* és un fet important en l'origen de les leucèmies infantils, com s'ha pogut observar amb les targetes de Guthrie. Les t(4;11)(q21;q23) o la t(12;21)(p13;q22) poden ser l'esdeveniment primari en alguns casos de bessons monozigots en els que tots dos han desenvolupat una LLA. Una cèl·lula anòmala originada en un dels bessons es dissemina a l'altre per anastomosi. A nivell molecular la translocació és idèntica però la malaltia es desenvolupa en diferent moment en cadascun del bessons. Degut a esdeveniments secundaris (com la deleció de *ETV6* en el cas de t(12;21)) la leucèmia es precipita de forma més o menys tardana. En la t(4;11) el període de latència és força curt suggerint que la translocació per si mateixa indueix la leucèmia. El retràs en el inici de la leucèmia en el segon bessó pot deixar a la llum una fase preleucèmica asimptomàtica amb les mateixes anomalies cromosòmiques presents en el primer bessó (Greaves *et al.* 2003; Broadfield *et al.* 2004). Casos amb hiperdiploïdia poden tenir també un origen prenatal (Maia *et al.* 2003).

1.4.2.4. Manifestacions clíniques

La LLA-B cursa amb trombocitèmia, anèmia o neutropènia com a conseqüència de la fallada de la MO. Pot presentar adenopaties generalment cervicals, esplenomegàlia i hepatomegàlia. A l'adult, no es detecten lesions òssies ni infiltració testicular comú en nens. També pot presentar infiltració del sistema nerviós central (SNC). El recompte de leucòcits pot ser baix o molt elevat ($<5 \times 10^9/L$ - $>100 \times 10^9/L$ leucòcits). La majoria dels pacients presenten blastes a SP inclús en casos amb leucopènia i acostumen a presentar $>50\%$ de blastes en MO (WHO 2008).

1.4.2.5. Immunofenotip

El perfil immunofenotípic en la LLA resulta imprescindible per a la identificació del grau de maduració que ha assolit el limfòcit leucèmic ja que, es correlaciona amb les dades genètiques i clíniques, així com per al diagnòstic diferencial amb la leucèmia aguda mieloide (LAM) molt indiferenciada o LLA d'origen T. L'*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL) va classificar les LLA-B segons els grau de maduresa dels blastes en base al perfil immunofenotípic (Bene *et al.* 1995)

(taula 2):

Taula 2. Perfils immunofenotípics en la LLA-B.

Tipus LLA-B	Marcadors
Pro-B	TdT+ HLA-DR+ CD19+ CD22+ CD79a+ CD10- μ cit-
Comú	TdT+ HLA-DR+ CD19+ CD22+ CD79a+ CD10+ μ cit-
Pre-B	TdT+ HLA-DR+ CD19+ CD22+ CD79a+ CD10+ μ cit+

Encara que els mateixos marcadors apareixen en els blastes normals, els blastes leucèmics sempre mostren un patró aberrant respecte la normalitat, de gran utilitat a l'estudi de la malaltia mínima residual durant el seguiment de la leucèmia (Craig 2007).

1.4.2.6. Alteracions citogenètiques

Cadascuna de les anomalies recurrents etiqueten la LLA com a entitat diferenciada segons la WHO. L'estudi citogenètic és un dels *gold standard* per classificar la LLA-B i establir grups pronòstic i administrar tractaments específics. La utilització de la FISH ha incrementat la detecció d'alteracions en els casos amb anomalies críptiques com la t(12;21)(p13;q22) o submicroscòpiques, en casos on no s'obtenen metafases o són de poca qualitat per un anàlisi citogenètic acurat i en casos amb cariotip complex. Així, la CC té una taxa d'èxit del 83% que s'incrementa fins el 91% amb I-FISH (Harrison *et al.* 2005). Combinant la CC i la FISH, s'observen en el 60-80% dels casos anomalies cromosòmiques clonals i al voltant del 25% presenten un cariotip normal (Moorman *et al.* 2007; Pullarkat *et al.* 2008; Harrison *et al.* 2010; per revisió Mrozek *et al.* 2009). Les anomalies citogenètiques recurrents identificades en la LLA són bàsicament alteracions numèriques específiques (*non random*) i translocacions equilibrades. Les

figures 12 i 13 mostren les anomalies més rellevants en la LLA-B i T en nens i adults, respectivament.

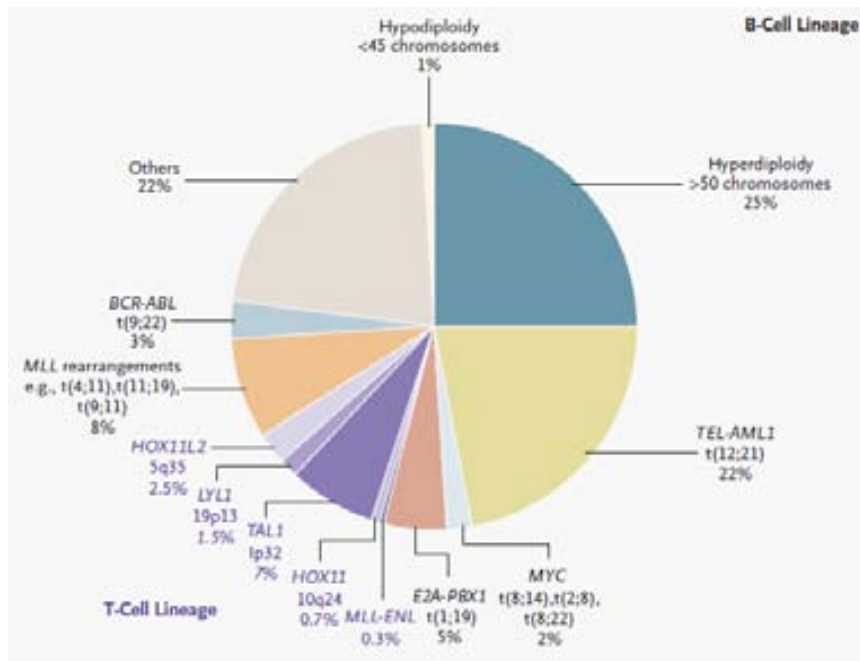


Figura 12. Distribució de les lesions gèniques en la LLA-B i LLA-T en nens (per revisió Pui *et al.* 2004).

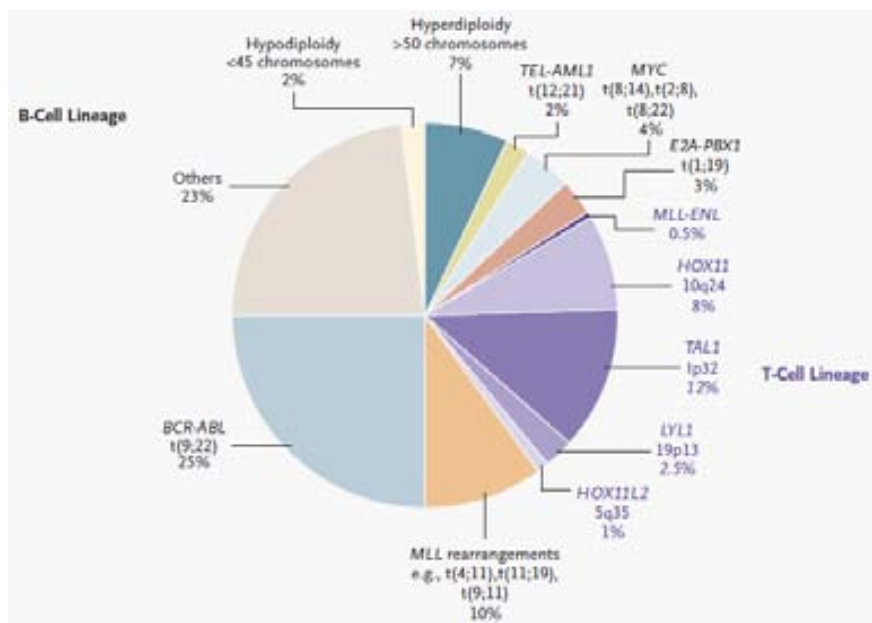


Figura 13. Distribució de les lesions gèniques en la LLA-B i LLA-T en adults (per revisió Pui *et al.* 2004).

La incidència de les anomalies cromosòmiques varia amb l'edat (**figura 14**). Durant el primer any de vida, la t(4;11) o reordenaments de *MLL* afecten al voltant del 75% dels

nadons amb LLA-B. En els anys posteriors, aquesta alteració és substituïda per la t(12;21) i l'alta hiperdiploïdia (HeH) fins a l'adolescència, i per l'aparició també de la t(9;22) més freqüent en l'adult. La t(9;22) està present en el 25% dels adults de >40 anys. En adolescents, adults joves (AYAs, *adolescent young adults*) i adults, les translocacions de *IGH* són més freqüents. La t(1;19) es troba a tots els grups d'edat i és relativament poc freqüent (Moorman *et al.* 2010a; per revisió Harrison 2011)

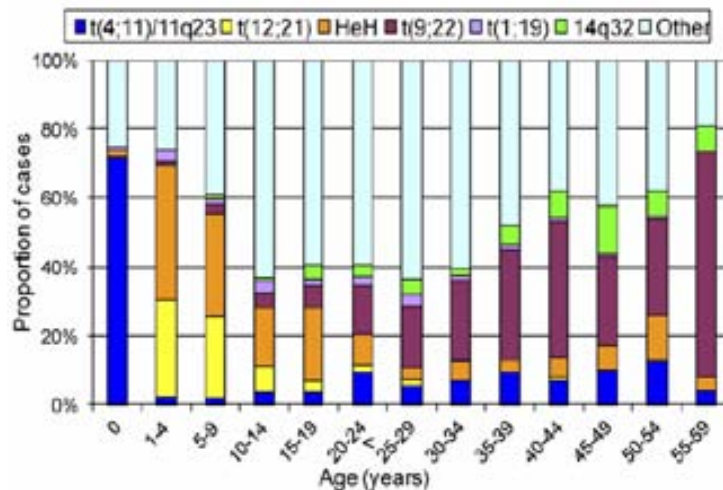


Figura 14. Distribució de les alteracions cromosòmiques en relació a l'edat (Harrison 2011).

Anomalies contemplades per la WHO:

- **LLA-B amb t(9;22)(q34;q11.2)/BCR-ABL1**

És l'alteració més freqüent en adults (25%) però està poc representada en nens (2-4%) (Moorman *et al.* 2007; Pullarkat *et al.* 2008; per revisió Mrozek *et al.* 2009). A la t(9;22) es fusiona el gen *BCR* en 22q11 amb el gen *ABL1* (*Abelson 1*) en 9q34 donant lloc un cromosoma 22q- anomenat cromosoma Philadelphia (Ph+) produint una proteïna de fusió BCR-ABL1. El protooncogèn *ABL1* codifica una proteïna tirosin cinasa (Tyr-K) i la seva activació està altament controlada. Per contra, el gen de fusió *BCR-ABL1* produeix una Tyr-K que està activada permanentment alterant les vies que controlen l'autorenovació, proliferació i supervivència cel·lular (per revisió Pui *et al.* 2004). Dos tercers parts dels pacients presenten anomalies afegides com el doble

Ph+, - 7 o 7p-, der(9p), +8, +21 o +X. La t(9;22) també pot aparèixer en casos amb hiperdiploidia.

- Pronòstic: és la LLA de pitjor pronòstic en nens i adults. L'únic tractament potencialment curatiu és el transplantament al·logènic. L'administració d'Imatinib (inhibidor de la Tyr-K) pot millorar la supervivència però, es pot desenvolupar resistència al tractament. Altres inhibidors de la Tyr-K com el Dasatinib formen part d'assajos clínics.

- **LLA-B amb t(v;11q23); MLL reordenat**

Les translocacions en les que està implicat el gen *MLL* (*mixed-lineage leukemia*) localitzat al cromosoma 11q23 afecten a 2/3 parts dels nens de <1 any amb LLA (Harrison *et al.* 2005), però és poc freqüent en joves i adults, i típicament cursen amb elevat recompte leucocitari. *MLL* és un factor de transcripció que regula l'expressió d'alguns gens *HOX*. Els gens que codifiquen proteïnes amb homeodominis s'anomenen *homeobox*, on s'inclou *HOX* i *PBX*. Les translocacions formen factors de transcripció quimèrics d'activitat augmentada, alterant l'expressió dels gens *HOX* (per revisió Pui *et al.* 2004). *MLL* té més de 80 *partners* descrits, el més comú és *AFF1* (*AF4*) a 4q21, que dona lloc a la t(4;11)(q21;q23)/*AFF1-MLL* en més de 50% dels casos. Una tercera part dels casos presenta anomalies adquirides com +X, anomalies en 7p, 9p i +8 (Moorman *et al.* 2007; per revisions: Mrozek *et al.* 2009; Gomez-Segui *et al.* 2012). Altres translocacions implicant al gen *MLL* són la t(11;19)(q23;p13)/*MLLT1(ENL)-MLL* amb les anomalies afegides +X, +8 i del(6q); la t(9;11)(p22;q23)/*MLLT3(AF9)-MLL* i la t(10;11)(p13-15;q23)/*MLLT10(AF10)-MLL*. S'ha observat que en el 15% del casos amb translocació de *MLL* poden estar acompanyats per mutacions de *FLT-3*, receptor de membrana amb activitat Tyr-K, que provocarien la seva activació.

- Pronòstic: les translocacions de *MLL* són de mal pronòstic. La t(4;11)(q21;q23) té molt mal pronòstic sobretot en nens de <3 mesos i adults grans. La t(11;19)(q23;p13)

també es pot detectar a la LLA-T i sembla conferir millor pronòstic que en el llinatge B.

- **LLA-B amb t(12;21)(p13;q22)/TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)**

La FISH ha fet possible la detecció de la translocació críptica t(12;21)(p13;q22) en el 25% de les LLA en nens, i gairebé no es dona en nadons ni adults (Harrison *et al.* 2005). El gen *TEL(ETV6)* localitzat a 12p12 pertany a la família de factors de transcripció ETS i està relacionat amb l'establiment de l'hematopoesi a la MO. *AML1(RUNX1)* localitzat a 21q22, codifica la subunitat d'unió a l'ADN del *core-binding factor* via HOX, reclutant histona acetilases que obren la cromatina permetent la transcripció. En fusionar-se, formen un factor de transcripció quimèric que segresta histona deacetilases que compacten la cromatina reprimint la transcripció (per revisió Pui *et al.* 2004). S'identifiquen anomalies afegides en 2/3 dels pacients com són la del(12p) de la segona còpia del gen *ETV6* en un 55-70% dels pacients, trisomia 21 i la duplicació del der(21).

- Pronòstic: és de pronòstic excel·lent (per revisió Mrozek *et al.* 2009). Inhibidors de les histonadeacetilases són estudi de possibles tractaments.

- **LLA-B amb hiperdiploïdies**

Afecta al 25-30% de nens amb LLA-B, no s'observa en nadons i és menys freqüent en adolescents i adults (2-10%) (per revisió Mrozek *et al.* 2009). En els casos amb HeH, el cariotip presenta de 51-65 cromosomes degut a trisomies específiques *non random*, habitualment sense anomalies estructurals. Els casos amb 47-50 cromosomes s'anomenen com baixa hiperdiploïdia. Els guanys més habituals són els dels cromosomes 21, X, 14, 4, 6, 18, 17 i 10 en >50% dels pacients, seguit de les trisomies 8, 5, 11 i 12 (Heerema *et al.* 2007). Poden presentar anomalies afegides com duplicacions de 1q, delecions de 6q o i(17)(q10). Entre un 3-10% dels casos presenten també mutacions de *FLT-3*.

- Pronòstic: en nens té un pronòstic excel·lent (Harrison *et al.* 2005; Paulsson i Johansson 2009). A l'adult tenen especial bon pronòstic els casos amb les trisomies 4, 10, 17 i 18 (per revisió Mrozek *et al.* 2009). Les anomalies afegides no semblen variar el pronòstic, exceptuant l'isocromosoma 17q.

- **LLA-B amb hipodiploïdies**

La presència d'un nombre de cromosomes proper a l'haploïdia (23-29 cromosomes), la baixa hipodiploïdia (33-39 cromosomes) o l'alta hipodiploïdia (42-45 cromosomes) és poc freqüent (1-5%). Es dona per guanys de cromosomes específics sobre el nombre haploide (Harrison *et al.* 2004). En la majoria de casos, una duplicació en el nombre de cromosomes d'aquest clona resulta en l'aparició d'un cariotip al voltant de 50 cromosomes amb tetrasomies que es pot confondre amb la HeH.

- Pronòstic: està associada a mal pronòstic. És important la distinció entre els casos amb duplicació de cromosomes d'una clona hipodiploides (per la presència de tetrasomies) dels casos amb HeH reals (amb trisomies), ja que el pronòstic varia de desfavorable a favorable, respectivament (Moorman *et al.* 2007; per revisió Harrison 2011).

- **LLA-B amb t(1;19)(q23;p13.3)/E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)**

La translocació en la que estan implicats els gens *E2A* (*TCF3*, en 19p13) i *PBX1* (1q23) és relativament comú en la LLA-B en nens (fins 6%) i menys freqüent en adults (fins 3%) i representa el 25% dels casos de LLA amb immunofenotip pre-B (Moorman *et al.* 2007; per revisió Mrozek *et al.* 2009). La proteïna de fusió que es produeix del der(19) interfereix també en la via de transcripció de senyals mediada per *HOX* (per revisió Pui *et al.* 2004).

- Pronòstic: generalment no té bon pronòstic encara que les noves teràpies el milloren. La presència de la t(1;19) s'ha establert com a factor de risc en les recaigudes del SNC en nens.

- **LLA-B amb t(5;14)(q31;q32)/IL3-IGH**

Aquesta alteració detectable per CC és rara en nens i adults i està present en <1% de LLA i poden cursar amb eosinofília. La unió del gen *IL3* (*Interleukin 3*) localitzat a 5q31 amb el gen *IGH* en 14q32 resulta en sobreexpressió de *IL3* per activació constitutiva. Encara que és un subgrup molt petit, la WHO la considera una entitat diferenciada de pronòstic intermedi.

Anomalies cromosòmiques no contemplades per la WHO:

- Translocacions t(v;14q32)/IGH

Les translocacions en les que s'implica el gen *IGH* localitzat a 14q32 tenen una incidència del 2-4% en nens i 8-11% d'adults amb LLA, i són més freqüents en nens grans, adolescents i adults (Akasaka *et al.* 2007; Dyer *et al.* 2010; per revisions: Harrison 2011; Chapiro *et al.* 2013). Algunes regions cromosòmiques o determinats gens són particularment propensos a originar alteracions cromosòmiques. En les hemopaties malignes limfoides d'origen B el gen *IGH* pot translocar-se implicant a diferents *partners* (taula 2).

Taula 2. Translocacions t(v;14q32) i gens implicats en la LLA-B.

Translocació	Gens implicats	Autors
t(1;14)(q21;q32)	<i>BCL9-IGH</i>	Willis <i>et al.</i> 1998
t(1;14)(q25;q32)	<i>LIM(Lhx4)-IGH</i>	Kawamata <i>et al.</i> 2002
t(6;14)(p22;q32)	<i>ID4-IGH</i>	Bellido <i>et al.</i> 2003
t(8;14)(q11;q32)	<i>CEBPD-IGH</i>	Kaleem <i>et al.</i> 2000
t(9;14)(p21;q32)	<i>CDKNA-IGH</i>	Duro <i>et al.</i> 1996
t(11;14)(q24;q32)	miRNA125b- <i>IGH</i>	Chapiro <i>et al.</i> 2010 Tassano <i>et al.</i> 2010
t(14;14)(q11;q32) inv(14)(q11q32)	<i>CEBPE-IGH</i>	Liu <i>et al.</i> 2004 Akasaka <i>et al.</i> 2007
t(14;19)(q32;q13) t(14;19)(q32;p13)	<i>CEBPA/CEBPG-IGH</i> <i>EPOR-IGH</i>	Robinson <i>et al.</i> 2004; Akasaka <i>et al.</i> 2007 Russell <i>et al.</i> 2009a
t(14;20)(q32;q13)	<i>CEBPB-IGH</i>	Akasaka <i>et al.</i> 2007
t(X;14)(p22;q32) t(Y;14)(p11;q32)	<i>CRLF2-IGH</i>	Russell <i>et al.</i> 2009b

Aquestes translocacions són rares en la LLA-B però són comuns en les neoplàsies hematològiques limfoides de cèl·lules B madures com la $t(8;14)(q24;q32)/C-MYC$ del limfoma de Burkitt, la $t(11;14)(q13;q32)/CCND1$ del limfoma del mantell o la $t(14;18)(q32;q21)/BCL2$ del limfoma fol·licular entre d'altres (per revisió Willis i Dyer 2000). Els trencaments en l'ADN que es produeixen de forma natural durant la recombinació dels segments VDJ del gen *IGH* predisposa a aquest locus a ser diana de translocacions. Com a conseqüència es produeix una expressió ectòpica dels gens que es juxtaposen o es desregula l'expressió dels oncogens que cauen sota el control del promotor de *IGH*.

Translocacions del gen *IGH* amb gens de la família *CEBP*:

Entre altres *partners* de *IGH*, apareix un subgrup on s'inclouen 5 gens de la família de factors de transcripció *CEBP* (*CCAAT enhancer-binding protein*) de gran importància en la proliferació i diferenciació cel·lular. Les proteïnes de la família *CEBP* conserven l'extrem carboxi-terminal comú a tots els membres, i poden presentar diferents isoformes segons el punt d'inici de la traducció en l'extrem amino-terminal. L'efecte de la sobreexpressió d'aquests gens en el desenvolupament de les neoplàsies limfoides no és clar (Akasaka *et al.* 2007). Aquestes translocacions són:

- **$t(8;14)(q11;q32)/CEBPD-IGH$:** la translocació que implica a *CEBPD* localitzat 8q11, és la més freqüent d'aquest grup i sembla estar més associada a síndrome de Down (Kaleem *et al.* 2000).
- **$t(14;14)(q11;q32)$ i $inv(14)(q11q32)/CEBPE-IGH$:** impliquen a *CEBPE* localitzat a 14q11 (Liu *et al.* 2004; Akasaka *et al.* 2007).
- **$t(14;19)(q32;q13)/CEBPA/CEBPG-IGH$:** pot implicar tant a *CEBPA* com a *CEBPG*, tots dos localitzats a 19q13. La translocació també s'ha descrit en la LLC atípica (aLLC) però en aquest cas el *partner* és *BCL3*. En la LAM, *CEBPA* pot actuar com gen supressor de tumors (Robinson *et al.* 2004; Akasaka *et al.* 2007).

- **t(14;20)(q32;q13)/CEBPB-IGH:** implica el gen *CEBPB* localitzat a 20q13 (Akasaka *et al.* 2007).

Translocacions del gen *IGH* amb gens dels receptors de citokines:

Un altre subgrup de *partners* que es juxtaposen al promotor de *IGH* són els gens dels receptors de les citokines *EPOR* (*eritropoietin receptor*), *CRLF2* (*cytokine receptor-like factor 2*) i *IL-3* (mencionat en la LLA-B amb t(5;14)(q31;q32) segons la classificació de la WHO). Els senyals intracel·lulars que generen els receptors de citoquines són essencials per la supervivència, proliferació i diferenciació de les HSC. Aquestes translocacions són:

- **t(14;19)(q32;p13)/EPOR-IGH:** implica al gen *EPOR* localitzat a 19p13, sobreexpressant-lo. *EPOR* intervé en la formació dels progenitors eritropoètics. De forma normal, no s'expressa en els precursors del limfòcits B, per tant l'expressió de *EPOR* en la LLA-B és ectòpica (Russell *et al.* 2009a).
- **t(X;14)(p22;q32)/CRLF2-IGH i t(Y;14)(p11;q32)/CRLF2-IGH:** impliquen al gen *CRLF2* localitzat a la regió pseudoautosòmica PAR1 dels cromosomes sexuals donant lloc a dues translocacions críptiques detectables per tècniques moleculars. La translocació no afecta a la regió codificant de *CRLF2*, sinó a la regió centromèrica del gen. S'han identificat també delecions intersticials de PAR1 del(X)(p22) o del(Y)(p11) en pacients de menor edat que els que presenten les translocacions (edat mitjana 4 vs. 16 anys). Aproximadament la meitat dels pacients amb delecio de PAR1 presenten el síndrome de Down. L'adició d'una X o der(X), comú en les leucèmies de pacients amb síndrome de Down, o una delecio proximal a *CRLF2* poden presentar-se com anomalia afegida en els casos de translocació. La sobreexpressió de *CRLF2* intervé en la transformació limfoide en la LLA-B i s'associa a l'activació de la via de transducció de senyals JAK-STAT (Russell *et al.* 2009b).

Translocacions del gen IGH amb altres partners:

- **t(1;14)(q21;q32)/BCL9-IGH:** implica el gen *BCL9* (*B-cell CLL/lymphoma 9*). Aquesta translocació s'ha descrit en gairebé en tots els limfomes no Hodgkin i en MM, però en la LLA té punts de trencament específics (Willis *et al.* 1998, per revisió Willis i Dyer 2000). Les anomalies a 1q21-25 són un *hotspot* de translocacions i duplicacions en les hemopaties malignes.
- **t(1;14)(q25;q32)/LIM(Lhx4)-IGH:** implica el gen de la proteïna homeodomini *LIM*, *Lhx4*, sobreexpresant-lo. Aquesta sobreexpressió podria tenir un efecte antiapoptòtic més que proliferatiu (Kawamata *et al.* 2002).
- **t(6;14)(p22;q32)/ID4-IGH:** desregula el gen *ID4* (*inhibitor of DNA binding 4*) codificant d'una proteïna inhibidora *helix-loop-helix* localitzat a 6p22, que en sobreexpresar-se podria actuar com a oncogen. La desregulació de *ID4* no és comú en la LLA però sí podria estar present en altres leucèmies d'origen limfoide (Bellido *et al.* 2003). A 6p22 i 14q32 existeixen seqüències repetitives Alu susceptibles a errors durant la replicació de l'ADN, que podrien afavorir la translocació. A aquesta translocació poden associar-se delecions de *CDKN2A* o *PAX5* com a conseqüència de la formació del i(9q)(q10). Aquest grup de pacients semblen tenir bona resposta al tractament (Russell *et al.* 2008).
- **t(11;14)(q24;q32)/miR125b-1-IGH:** implica el microRNA miR125b-1 codificat a 11q24, sobreexpresant-lo. El miR125b-1 promou la proliferació i supervivència, però el seu rol en la transformació limfoide està per determinar (Chapiro *et al.* 2010; Tassano *et al.* 2010).

- Altres anomalies cromosòmiques

Existeixen altres anomalies cromosòmiques que per sí mateixes tampoc tenen suficient entitat per ser considerades en grups independents per la WHO. Algunes d'aquestes anomalies que no tenen un impacte pronòstic definit són: del(6q), del(9p), del(12p) i cariotip normal. El cariotip complex (amb 5 o més anomalies

cromosòmiques) mostra resultats contradictoris. Mentre que en alguns estudis no mostra impacte clínic (Wetzler *et al.* 2004) en altres sí sembla conferir un pitjor pronòstic (Moorman *et al.* 2007). L'amplificació intracromosòmica del cromosoma 21 (iAMP21) és una anomalia recurrent cada cop més freqüentment (en <1% en adults i un 2% en nens) gràcies a la utilització de sondes per la identificació de la t(12;21) (Soulier *et al.* 2003; per revisió Harrison 2009). Aquests pacients són negatius per la t(12;21) però presenten múltiples còpies (3 o més) del gen *AML1(RUNX1)*. En metafase es mostra com un cromosoma 21 aberrant variable entre els diferents pacients, i la totalitat pertany a material de cromosoma 21 amb les còpies de *RUNX1* disposades en tàndem. En interfase els senyals apareixen en grup. Sembla de mal pronòstic, però pot variar depenent de la teràpia. La t(17;19)(q22;p13), variant de la t(1;19)(q23;p13.3) és de molt mal pronòstic.

1.4.2.7. Altres canvis gènics i epigenètics

Les alteracions esmentades semblarien ser en molts casos insuficients per iniciar el procés neoplàsic. Són necessàries altres mutacions submicroscòpiques iniciadores de la leucèmia en gens implicats en el desenvolupament, diferenciació i control del cicle cel·lular del limfòcit que inactiven gens com el *RB* (13q14), o que afecten a molècules que intervenen en la via de P53 com delecions de *CDKN2A* (9p21) codificant de les proteïnes p16^{INK4} i p14^{ARF} reguladors del cicle cel·lular. També són importants les delecions de *PAX-5* (9p13), *IKZF1* (7p12) en el 84% de les LLA amb t(9;22), i la delecio de *ETV6* en els casos amb t(12;21). També poden actuar mutacions activadores com en el cas de *FLT-3* present en el 15% dels reordenaments del gen *MLL* o fins al 10% en casos amb HeH (per revisions: Pui *et al.* 2004; Harrison 2011).

Així mateix, el blast pot patir en el seu ADN canvis epigenètics. La LLA en nens i adults mostra patrons de metilació aberrants. La metilació en els promotors de gens reguladors resulta en la inhibició de la transcripció de gens supressors de tumors com en el cas del gen *CDK2NA* i *CDK2NB* (per revisió Mrozek *et al.* 2009).

1.4.2.8. Anomalies cromosòmiques i pronòstic

A banda de l'edat de diagnòstic, el recompte de leucòcits, la resposta al tractament i la presència de malaltia mínima residual, l'estudi citogenètic ha esdevingut un dels factors pronòstic independent més importants en la LLA i s'utilitza en l'estratificació del grup de risc i tractament (WHO 2008). El pronòstic de les anomalies citogenètiques descrites en la LLA, els gens implicats i grup d'edat de desenvolupament es resumeixen a la **taula 3**.

Taula 3. Anomalies cromosòmiques més freqüents i grups pronòstic en la LLA-B. Adaptada de WHO 2008, Mrozek *et al.* 2009 i Harrison 2011.

Grup pronòstic i Tipus d'alteració	Anomalia cromosòmica	Gens implicats	Grup d'edat
Bon pronòstic			
Translocació críptica	t(12;21)(p12;q22) críptica	<i>TEL(ETV6)-AML1(RUNX1)</i>	Nens i AYAs
HeH	Trisomies, 51-65 cromosomes	Guany cromosòmics	Nens i adults
Pronòstic intermedi			
Translocació <i>TCF3</i>	(1;19)(q23;p13.3)	<i>TCF3-PBX1(E2A-PBX1)</i>	Tots
Delecions	del(9p) del(6q) del(12p)	<i>CDK2NA, PAX-5...</i> Múltiples <i>ETV6</i>	Tots
Baixa hiperdiploïdia	Trisomies, 47-50 cromosomes	Guany cromosòmics	Adults
iAMP21	der(21)	Amplificació <i>RUNX1</i>	Nens grans
Translocacions <i>IGH</i>	t(5;14)(q31;q32) t(14;19)(q32;q13) t(14;20)(q32;q13) t(8;14)(q11;q32) t(14;14)(q11;q32)/inv(14)(q11q32) t(6;14)(p22;q32) t(14;19)(q32;p13) t(X;14)(p22;q32)/t(Y;14)(p11;q32)	<i>IL3-IGH</i> <i>CEBPA/CEBPG-IGH</i> <i>CEBPD-IGH</i> <i>CEBPE-IGH</i> <i>ID4-IGH</i> <i>EPOR-IGH</i> <i>CRLF2-IGH</i>	AYAs i adults
Cariotip complex	5 o més anomalies	Múltiples	Adults i nens
Cariotip normal	No identificades	No identificats	Tots
Mal pronòstic			
Cromosoma Philadelphia	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	Adults i nens
Translocacions <i>MLL</i>	t(4;11)(q21;q23) t(11;19)(q23;p13) t(10;11)(p13-15;q23) t(9;11)(p22;q23)	<i>AFF1-MLL</i> <i>MLLT1-MLL</i> <i>MLLT10(AF10)-MLL</i> <i>MLLT3(AF9)-MLL</i>	Tots
Translocació <i>TCF3 variant</i>	t(17;19)(q22;p13)	<i>TCF3-HLF</i>	Tots
Hipodiploïdia	24-29 cromosomes 31-39 cromosomes	Guany cromosòmics sobre el nombre haploide	Nens Adults

A diferència dels nens, en els adults el valor pronòstic de la citogenètica no està suficientment establert. La baixa incidència de la LLA en l'adult i que la majoria són Ph+, fa que la presència d'altres anomalies cromosòmiques siguin tan poc freqüents que és difícil fer grups de risc i el resultat entre les diferents sèries és variable. La supervivència global (SG) en l'adult als 5 anys del diagnòstic estaria en el 30% i és relacionada amb l'edat i les anomalies citogenètiques; els pacients Ph+ d'alt risc (més grans) tenen una supervivència del 9% i els pacients amb HeH de baix risc (més joves) del 77%. La supervivència lliure de recaiguda (SLR) no estaria relacionada amb l'edat, però sí amb el grup citogenètic (Moorman *et al.* 2007; Pullarkat *et al.* 2008; Moorman *et al.* 2010b; per revisions: Harrison 2011; Gomez-Segui *et al.* 2012).

1.4.3. LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA B

La LLC és una proliferació limfoide clonal que es caracteritza per l'acumulació de limfòcits B madurs a SP, MO, melsa o ganglis. En el *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL)* (per revisió Hallek *et al.* 2008) es van establir els criteris diagnòstics de LLC com la presència d'una limfocitosi $\geq 5 \times 10^9/L$ limfòcits B monoclonals a SP i immunofenotip de LLC. La LLC es diferencia del limfoma de cèl·lules petites (LCP) per l'aparença leucèmica. Aquests limfòcits són petits, de nucli rodó amb cromatina condensada sense nuclèol i citoplasma escàs. En la aLLC els limfòcits tenen el nucli amb fenedura i poden presentar-se fins a un 55% de prolimfòcits. Les ombres de Gumprecht s'observen habitualment en les preparacions de SP com a restes cel·lulars.

Contràriament al que succeeix en altres leucèmies o limfomes, la LLC és més una hemopatia acumulativa de limfòcits B madurs degut a senyals de supervivència i antiapoptòtiques que no pas proliferativa, encara que l'acumulació de cèl·lules estaria també associada a major proliferació del que es creia fins el moment (per revisions: Chiorazzi *et al.* 2005; Zenz *et al.* 2010).

El curs clínic és molt variable; des de indolent amb llarga supervivència fins a un curs agressiu i refractari al tractament amb pocs mesos de vida. En els estadis inicials de la malaltia, generalment no requereixen tractament a no ser que hi hagin evidències de progressió. Encara que la LLC es considera una malaltia incurable, s'han produït importants avenços gràcies a la identificació de les alteracions gèniques i estratificació en grups pronòstic que impliquen l'administració de tractaments específics.

1.4.3.1. Epidemiologia

La LLC és la leucèmia més comú dels adults en els països occidentals, amb una incidència de 2-6/100.000 persones l'any, i representa entre el 30-40% de les leucèmies. Aquesta incidència s'incrementa amb l'edat arribant a 12,8/100.000 persones de 65 anys (mitjana d'edat al diagnòstic). Actualment s'està diagnosticant cada cop amb més freqüència en pacients més joves. La LLC té una prevalença de 1,5-2:1 (home:dona) (WHO 2008).

1.4.3.2. Etiologia

La causa que l'origina la LLC és desconeguda però, existeixen indicis que suggereixen un possible origen genètic. L'aparició de la LLC en els països orientals és força rara. Estudiant poblacions orientals que han emigrat a països occidentals, no sembla que augmenti la incidència de la malaltia en aquestes poblacions, per tant, es podrien descartar factors ambientals, suggerint una predisposició genètica a patir-la. També té un component familiar. Entre el 2-5% dels pacients tenen 2 o més familiars afectes. El risc de patir la malaltia entre els familiars de primer grau s'incrementa de 2-7 vegades. En aquests casos de LLC familiar, esdevé un fenomen d'anticipació on l'edat del diagnòstic s'avança de 10-15 anys en la segona generació (Yuille *et al.* 1998).

Estudis de citometria de flux indiquen que 3-12% dels individus sans presenten petites poblacions de limfòcits clonals tipus LLC en SP (Ghia *et al.* 2004; per revisió Rawstron 2009). Gairebé totes les LLC han passat per una fase prèvia de limfocitosi B

monoclonal (LBM).

- Limfocitosi B monoclonal: segons la WHO es caracteritza per ser una expansió clonal amb recompte de limfòcits absoluts $<5 \times 10^9/L$ a SP, amb immunofenotip específic (de LLC, aLLC o CD5-) i absència de limfadenopaties, organomegàlies, citopènies ni símptomes relacionats (per revisió Shanafelt *et al.* 2010). El 1-2% de les LBM evolucionen a LLC per any. La LBM podria considerar-se un factor predisposant a la LLC (per revisió Montserrat i Moreno 2009). La incidència es veu incrementada al 7-12% en familiars de primer grau de pacients amb LLC (Rawstron *et al.* 2002a; Rawstron *et al.* 2002b; de Tute *et al.* 2006). Mitjançant estudis d'SNPs (*single nucleotide polymorphism*) s'ha observat que determinats polimorfismes són susceptibles a desenvolupar una LBM (Crowther-Swanepoel *et al.* 2010). La LBM pot presentar les mateixes anomalies recurrents que s'observen en la LLC però les associades a pronòstic desfavorable, com les delecions 11q i 17p, són molt poc freqüents i amb una proporció de cèl·lules patològiques baixa degut a que és un estadi inicial en l'evolució de la malaltia (per revisió Rawstron 2009).

1.4.3.3. Manifestacions clíniques

Les dades clíniques en els pacients amb LLC poden ser molt variables. Molts no presenten simptomatologia i en molts casos el diagnòstic es fa de forma casual en una analítica rutinària que presenta leucocitosi i limfocitosi. Altres, poden presentar anèmia, plaquetopènia i símptomes d'astènia i cansament, anèmia hemolítica autoimmune i infeccions recurrents degudes a alteracions immunitàries, i els "símtomes B" com són febre, sudoració nocturna i pèrdua de pes. També poden cursar amb esplenomegàlia, hepatomegàlia i adenopaties.

1.4.3.4. Origen del limfòcit B patològic i estat mutacional *IGHV*

L'origen del limfòcit B patològic en la LLC no està suficientment clar. Es creu que el

limfòcit que desencadena la leucèmia és un limfòcit madur que ha estat en contacte amb l'antigen, però que es diferencia per l'estat mutacional de *IGHV* (presència o absència de les hipermutacions somàtiques adquirides en la maduració) donant lloc a les LLC amb *IGHV* mutat (amb <98% d'homologia respecte la línia germinal) i les LLC amb *IGHV* no-mutat (amb $\geq 98\%$ d'homologia) (per revisions: Chiorazzi *et al.* 2005; Zenz *et al.* 2010).

La via d'activació del limfocit B T-dependent (**figura 15, esquerra**) succeeix al centre germinal produint-se les hipermutacions somàtiques de *IGHV* que originen els limfòcits *IGHV* mutats. Aquestes hipermutacions de vegades també poden afavorir l'autoreactivitat en front a antigens dels propi cos. La hipòtesi del desenvolupament d'aquesta LLC és que si una d'aquests limfòcits adquireix una alteració genètica que li confereix avantatges o resistència, estarà predisposat a una transformació leucèmica. Com és un limfòcit autoreactiu, l'exposició al mateix antigen és més continuada i podria provocar una expansió clonal del limfòcit leucèmic (per revisió Chiorazzi *et al.* 2005).

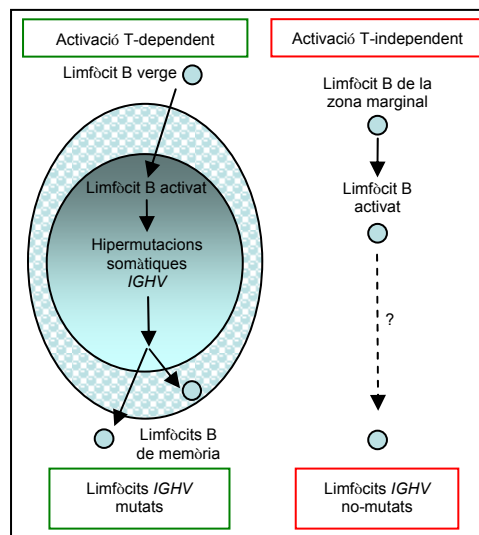


Figura 15. Maduració i origen dels limfòcits B en la LLC.

La via d'activació del limfòcit B T-independent (**figura 15, dreta**) es creu que succeeix a la zona marginal i per un mecanisme desconegut pot generar limfòcits *IGHV* no-

mutats. La hipòtesi del desenvolupament d'aquesta LLC és que molts limfòcits B *IGHV* no-mutats normals produeixen anticossos capaços d'unir-se a múltiples antigens com a primera línia de defensa i a autoantigens. De la mateixa manera que en el cas anterior, si un d'aquests limfòcits adquireix una alteració genètica podrà transformar-se. Les LLC mutades tenen una resposta baixa als estímuls que rep el BCR i més estabilitat genètica, mentre que les no-mutades responen més i són genèticament més inestables.

1.4.3.5. Estadiatge

Clàssicament, per definir l'extensió de la malaltia així com per fer una primera avaluació del pronòstic s'utilitzen els sistemes d'estadiatge descrits per Rai i Binet (Rai *et al.* 1975; Binet *et al.* 1981) basats en la limfocitosi, adenopaties, organomegàlies i citopènies que es mostren a les **taules 5 i 6**, respectivament. Aquests sistemes ajuden a decidir l'inici del tractament però no són útils per classificar els pacients en els estadis més inicials.

Taula 5. Estadis de Rai.

Estadi	Afectació
0	Limfocitosi aïllada
I	Limfocitosi + adenopaties
II	Limfocitosi + hepatomegàlia i/o esplenomegàlia
III	Limfocitosi + anèmia
IV	Limfocitosi + plaquetopènia

Taula 6. Estadis de Binet.

Estadi	Afectació
A	Limfocitosi i <3 àrees afectes
B	Limfocitosi i ≥3 àrees afectes
C	Limfocitosi + anèmia i/o plaquetopènia

En ambdós casos, l'anèmia s'estableix en Hb <10 g/dL i la plaquetopènia en <100x10⁹/L. La classificació de Rai contempla 5 estadis: l'estadi 0 de baix risc, I i II de risc intermedi, i III i IV d'alt risc, i la de Binet 3 estadis A, B i C, i es consideren 5 àrees d'afectació: adenopaties cervicals i/o supraclaviculars, adenopaties axil·lars, adenopaties inguinals, fetge i melsa.

1.4.3.6. Immunofenotip

Els limfòcits de la LLC habitualment coexpressen CD5, CD19 i CD23 (WHO 2008).

També són positius per els marcadors CD20, CD22, CD79a i CD43 i de expressen forma dèbil CD11c i IgM/IgD de superfície. Són CD10 negatius i, CD79b i FMC7 negatius o positius dèbils. La població de limfòcits leucèmics mostra clonalitat de cadena lleugera κ o λ (Craig 2007). Amb l'immunofenotip es va establir un sistema de puntuació que diferencia la LLC d'altres tipus de SLP-B, vigent actualment (**taula 7**). Amb 4-5 punts sobre 5 punts totals donen suport al diagnòstic de LLC (Matutes *et al.* 1994; Moreau *et al.* 1997).

Taula 7. Sistema de puntuació de la LLC.

Marcador	Expressió	Puntuació
IgM de superfície	Dèbil/moderada	+1
CD5	Positiu	+1
CD23	Positiu	+1
CD79b	Negatiu/dèbil	+1
FMC7	Negatiu	+1

1.4.3.7. Estudi citogenètic

El baix índex mitòtic que presenten els limfòcits i la presència d'alteracions submicroscòpiques fan que l'anàlisi per CC sigui en molts casos poc efectiva. Per resoldre aquestes limitacions es fa ús de mitògens o estimulants de limfòcits B per l'obtenció de metafases, a més d'emprar la I-FISH la qual no requereix de cèl·lules en divisió i és capaç d'identificar alteracions submicroscòpiques. La facilitat en l'anàlisi de cèl·lules en interfase de forma rutinària semblava deixar de banda temporalment la CC però recentment, la utilització de nous mitògens està fent ressorgir la CC per tal d'avaluar globalment el cariotip.

1.4.3.7.1. Tècniques citogenètiques

Mitjançant la combinació de les tècniques de CC i FISH només s'observen un 15% de casos normals. La importància que ha recobrat el cariotip gràcies a l'efectivitat actual dels mitògens recau en la identificació d'alteracions gèniques més enllà de les regions analitzades en la bateria de sondes de FISH, però la detecció de les alteracions submicroscòpiques únicament és possible mitjançant la FISH.

1.4.3.7.1.1. Citogenètica convencional

La informació global que proporciona la CC es veu restringida a les cèl·lules en divisió. Inicialment, els mitògens més utilitzats en la CC van ser el lipopolisacàrid de *E.Coli* (LPS), la fitohemaglutinina (PHA) i el *pokeweed mitogen* (PWM) però aquests van ser poc útils en l'estudi de les LLC ja que estimulen preferentment limfòcits T. Altres mitògens com el virus Epstein-Barr (EBV) i el *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA) que estimulen principalment els limfòcits B van començar a donar bons resultats (Callen i Ford 1983; Ross i Stockdill 1987; Juliusson *et al.* 1990), però tot i així, de vegades no s'obtenen metafases i si s'obtenen, algunes metafases normals també són producte de la divisió dels limfòcits T (Losada *et al.* 1991). Aquests mitògens van permetre la detecció d'anomalies cromosòmiques en el 40-50% dels pacients amb LLC essent la trisomia 12 l'alteració més freqüent, seguida de la deleció 13q i alhora que es va fer una primera aproximació del pronòstic de les lesions (Juliusson *et al.* 1990).

Més recentment el CD40-ligand (CD40L), les IL, els oligonucleòtids CpG rics en guanines i citosines, o una combinació d'aquests s'utilitzen per tal de rescatar els limfòcits B quiescents i activar la proliferació per l'obtenció de metafases.

- L'estimulació amb CD40L: indueix metafases en el 93% dels casos i es detecten alteracions en el 89% dels casos respecte el 22% que es detecten amb mètodes convencionals, però és de difícil d'aplicació rutinària (Buhmann *et al.* 2002; Mayr *et al.* 2006).

- La combinació d'oligonucleòtids CpG i IL-2 que originalment es va concebre per immunoteràpia, ha incrementat l'obtenció de metafases en el 95-98% dels casos i les alteracions cromosòmiques s'observen en un 83% dels casos vs. el 79% dels casos detectades per FISH. A més, identifica un 38% d'alteracions addicionals no identificades per FISH (Dicker *et al.* 2006; Haferlach *et al.* 2007). S'ha observat que els oligonucleòtids CpG són més efectius que la combinació del TPA i PWM segons alguns estudis comparatius de cultius *in vitro*, mentre que en altres, el TPA és superior a l'estimulació amb oligonucleòtids CpG combinat amb IL-2 en quant a la taxa d'èxit

del cultiu, l'obtenció de metafases i la detecció d'anomalies cromosòmiques i, es recomana la combinació de tots tres mitògens (Heerema *et al.* 2010; Wren *et al.* 2010).

1.4.3.7.1.2. Hibridació *in situ* fluorescent interfàsica

La I-FISH ha esdevingut la tècnica rutinària en el diagnòstic citogenètic de la LLC ja que a més de no necessitar cèl·lules en divisió, identifica pèrdues submicroscòpiques d'ADN. Habitualment es realitza en cèl·lules mononuclears de SP separades per gradient de densitat però també es pot realitzar en cultius cel·lulars amb o sense estimulació (**taula 8**). Mitjançant la I-FISH es va demostrar que la incidència de les aberracions gèniques estava subestimada en la CC degut a: la baixa proliferació, a que amb la CC s'analitzen cariotips normals que poden derivar dels limfòcits T i no dels limfòcits B clonals, i que algunes alteracions estan per sota de la resolució de la CC. En base a les dades obtingudes en la CC (Juliussen *et al.* 1990) i la hibridació genòmica comparada (CGH) (Bentz *et al.* 1995) es va dissenyar un conjunt de sondes específiques de les principals anomalies en la LLC. Fent ús de la I-FISH, el 82% del pacients mostren alteracions cromosòmiques i la deleció 13q14 passa a ser l'anomalia més freqüent en el 55% dels pacients, seguida de la deleció 11q23 (18%), trisomia 12

Taula 8. Incidència de les anomalies cromosòmiques identificades per I-FISH en la LLC.

Autors	Mostra	Mètode	Anomalies cromosòmiques (%)				
			Total	del(13q14)/bi	+12	del(11q23)	del(17p13)
Dohner <i>et al.</i> 2000	SP	CMGD	82	55/13	16	18	7
Dewald <i>et al.</i> 2003	SP/MO	CMGD	77	56/19	18	11	5
Aoun <i>et al.</i> 2004	SP/MO	C-	72	46/14	21	7	3
Sindelarova <i>et al.</i> 2005	SP/MO	C-	70	54/0	16	12	16
Glassman i Hayes 2005	MO	CLPS	64	40/ND	11	23	12
Dicker <i>et al.</i> 2006	SP/MO	CMGD	79	64/7	13	15	5
Reddy 2006	ND	ND	68	46/7	20	5	3
Stilgenbauer <i>et al.</i> 2007	SP	CMGD	92	61/20	22	22	2
Haferlach <i>et al.</i> 2007	SP/MO	CMGD	78	57/15	14	12	7

SP sang perifèrica; MO, medul·la òssia; CMGD, cèl·lules mononuclears separades per gradient de densitat; C-, cultiu sense estimulants; CLPS, cultiu estimulat amb lipopolisacàrid; ND, no disponible.

(16%), delecio 17p13 (7%) i delecio 6q21 (6%) (Dohner *et al.* 2000). La freqüència de cada alteració varia segons els diferents estudis realitzats possiblement degut a diferències entre les sèries o a la metodologia emprada (**taula 8**).

Amb la I-FISH, >50% dels casos anòmals presenten una única anomalia, entre el 20-30% dues anomalies i un 10% tres o més (Dohner *et al.* 2000; Dewald *et al.* 2003). Dohner *et al.* van correlacionar aquests resultats citogenètics amb les dades clíniques donant lloc a 5 categories pronòstiques sent la del(13q14) l'alteració de millor pronòstic i la del(17p13) la de pitjor pronòstic, fent de la citogenètica un dels factors pronòstic independents més importants.

1.4.3.7.2. Alteracions cromosòmiques

Les trisomies 12, 3, 18 i 19 i les pèrdues dels cromosomes X i Y són les alteracions numèriques més freqüents, així com les pèrdues de material en 13q i 11q i translocacions i cariotips complexes.

1.4.3.7.2.1. Delecio 13q14

Encara que la pèrdua de 13q14 no és una anomalia específica de la LLC, és l'anomalia gènica més freqüent, s'observa en el 55% dels pacients (Dohner *et al.* 2000). La identificació d'un gen candidat desregulat com a conseqüència de la pèrdua a 13q14 ha estat controvertit. En un primer moment es va pensar en el *RB* però va ser descartat com a principal mecanisme patogènic i la delecio es va situar en una regió rica en seqüències repetitives ALU susceptibles a inestabilitat cromosòmica, centromèrica a D13S272 (**figura 16**) (Corcoran *et al.* 1998; Bullrich *et al.* 2001). La regió mínima delecionada és de 30kb i conté el gen *DLEU2* (*deleted in lymphocytic leukemia 2*), el *cluster* de miRNAs miR-15a/16-1 i el primer exó de gen *DLEU1* (**figura 16**).

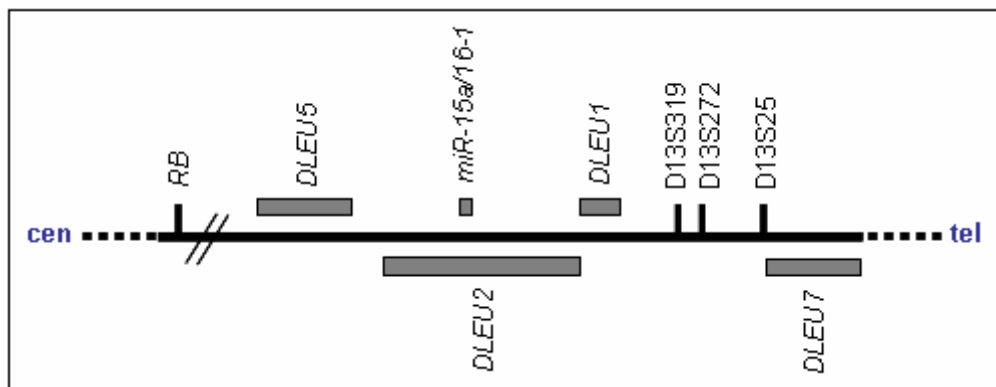


Figura 16. Mapa de la regió cromosòmica 13q14.

Els miR-15a i mi-R16-1 en *DLEU2*, són delecionats o amb baixa expressió fruit de la pèrdua de material a 13q14 en la LLC (Calin *et al.* 2002), suggerint que la delecíó de miR-15a/16-1 és suficient per iniciar el procés leucèmic a més d'altres gens que puguin contribuir al desenvolupament de la malaltia. Estudis de miRNAs semblen mostrar perfils específics en la LLC (Visone *et al.* 2009). El *cluster* miR-15a/16-1 intervé en funcions de creixement, control del cicle cel·lular i apoptosi, però el paper concret que juga en la LLC no està ben definit. La pèrdua d'aquests miRNAs regularia l'expressió de *BCL2*, gen antiapoptòtic que es troba altament expressat en la LLC (Dicker *et al.* 2006). Recentment però, s'ha descrit un cas de LLC familiar on la delecíó només afecta al gen *DLEU7* mapat telomèric a D13S25 (Mertens i Stilgenbauer 2012). Existeix una gran varietat en el tipus de delecíó 13q:

- Nombre d'al·lels delecionats:

La delecíó 13q s'observa principalment en heterozigosi o monoal·lèlica, però també es pot presentar en homozigosi o bial·lèlica, o concomitant mono/bial·lèlica. La delecíó bial·lèlica representa el 18-30% de les delecions de 13q14 i s'observa en el 15% de les LLC (Haferlach *et al.* 2007; Garg *et al.* 2012; Puiggros *et al.* 2013). Estudis seriatos en el diagnòstic i durant el seguiment de la malaltia suggereixen que la delecíó monoal·lèlica succeeix com a primer esdeveniment i que posteriorment es dona la delecíó de la segona còpia de 13q14 en un estadi més evolucionat (Shanafelt *et al.*

2006; Stilgenbauer *et al.* 2007). Els pacients amb del(13q14) monoal·lèlica mostren una cinètica de creixement limfocitari més lenta que en la delecio bial·lèlica suggerint un efecte de dosi gènica. L'adquisició de la del(13q14) bial·lèlica durant l'evolució clonal de la LLC, és compatible amb una combinació de mecanismes genètics i epigenètics (Mertens *et al.* 2006).

- Mida de la delecio:

En la majoria dels casos la delecio és críptica només detectable per FISH (Stockero *et al.* 2006) però en altres pot detectar-se per CC. Estudis d'SNPs descriuen una gran varietat en la mida de la delecio 13q14, establint dos subtipus de delecions: les de tipus I que impliquen *DLEU2* i miR15-a/16-1 observada en el 60% dels casos, i les delecions de tipus II més extenses amb pèrdua del gen *RB* en el 40% dels casos (Ouillet *et al.* 2008; Mosca *et al.* 2010; Parker *et al.* 2011).

- Associada a translocació:

En alguns casos la delecio és deguda a translocació (Gardiner *et al.* 1997; Struski *et al.* 2007). Les translocacions implicant a 13q14 s'observen en freqüències variables (7-16%) i sovint emmascaren una pèrdua submicroscòpica de material (Mayr *et al.* 2006; Haferlach *et al.* 2007; Wren *et al.* 2010). En la LLC, la majoria dels casos de

Taula 9. Translocacions equilibrades de 13q14 descrites en la LLC.

Gardiner <i>et al.</i> 1997	Hamblin <i>et al.</i> 1999	Mayr <i>et al.</i> 2006	Dicker <i>et al.</i> 2006	Wren <i>et al.</i> 2010
t(1;13)(p34;q14)	t(10;13)(q26;q14)	t(9;13)(p11;q14)		t(2;13)(q35;q14)
t(2;13)(q35;q14)	t(12;13)(p11;q14)	t(13;13)(q14;q22)	t(13;14)(q14;q32)	t(3;13)(p21;q14)
t(4;13)(p15;q14)	t(12;13)(q15;q14)	t(13;14)(q14;q25)	t(5;13)(q32;q14)	t(8;13)(p21;q14)
t(4;13)(q35;q14)	t(13;13)(q14;q22)	t(13;17)(q14;q11)	t(8;13)(q12;q14)	t(13;14)(q14;q32)
t(6;13)(p23;q14)	t(13;13)(q14;q32)	t(13;18)(q14;p11)		t(13;15)(q14;q24)
t(7;13)(p22;q14)	t(13;14)(q14;q24)	t(13;20)(q14;q11)		
t(8;13)(q11;q14)	t(13;16)(q14;q24)		t(10;13)(q24;q14)	
t(8;13)(q24;q14)	t(13;17)(q14;p11)			
t(9;13)(p11;q14)	t(13;18)(q14;p11)			
t(9;13)(q22;q14)	t(13;18)(q14;q23)			
t(13;22)(q14;q13)	t(13;20)(q14;q11)			
t(10;13)(p15;q14)				

translocació amb implicació de 13q14 són esporàdiques, exceptuant per el moment la $t(10;13)(q24;q14)/HOX11$, que no es considera recurrent però s'ha trobat en més d'un pacient (Dicker *et al.* 2006). Aquesta banda és susceptible a translocar-se amb múltiples *partners* com en el cas del gen *MLL* en la LAM. Algunes de les translocacions 13q equilibrades es mostren a la **taula 9**.

- Pronòstic:

En estudis inicials, els pacients amb 13q- com a única alteració mostraven bon pronòstic, generalment superior al casos normals amb una SG de 133 mesos (Dohner *et al.* 2000). Respecte a la zigositat, alguns autors no observen diferències en quant a la supervivència (Van Dyke *et al.* 2010; Dal Bo *et al.* 2011), però en altres estudis s'observa que la deleció bial·lèlica és de major agressivitat i progressió que la monoal·lèlica (Dewald *et al.* 2003; Chena *et al.* 2008). Respecte la mida de la deleció, les delecions de tipus II més extenses amb pèrdua del gen *RB* s'associen a major risc de progressió de la malaltia que les de tipus I (Ouillette *et al.* 2008; Mosca *et al.* 2010; Parker *et al.* 2011). Altres estudis no relacionen l'efecte advers de la mida de la regió delecionada, si no en la mida de la clona tumoral. Recentment està cobrant importància clínica el percentatge de cèl·lules aberrants (Catovsky *et al.* 2004). Diferents estudis demostren que pacients amb un alt percentatge de cèl·lules amb deleció 13q- (65%-80%) tenen una evolució pitjor que la dels pacients amb FISH normal o +12 i similar als pacients 11q-, cursant amb més agressivitat. En canvi, els pacients amb menys càrrega tumoral de cèl·lules 13q- tenen millor pronòstic que els pacients de FISH normal (Hernandez *et al.* 2009; Van Dyke *et al.* 2010; Dal Bo *et al.* 2011). Combinant la càrrega tumoral i la mida de la deleció, Dal Bo *et al.* (2011) observen que els casos amb <70% de cèl·lules anòmales i sense pèrdua del RB tenen molt bon pronòstic, mentre que els que perden el RB o tenen més dels 70% de cèl·lules delecionades i/o pèrdua del RB presenten una supervivència lliure de tractament (SLT) inferior.

1.4.3.7.2.2. Trisomia 12

Estudis inicials de CC i de I-FISH determinaven que aquesta alteració numèrica era l'anomalia més freqüent en la LLC (Juliussen *et al.* 1990; Losada *et al.* 1991), però es va rellevar a la segona posició per darrera de la deleció 13q (Dohner *et al.* 2000). Entre el 15-20% dels pacients de LLC presenten +12. És predominant en la aLLC que presenta limfòcits de morfologia atípica de nucli amb fenedura i cromatina en cúmuls, amb presència de prolimfòcits i expressió incrementada dels marcadors IgM de superfície i FMC7 (Hjalmar *et al.* 2000). Estudis de FISH mostren que es pot adquirir durant el seguiment, i que en casos de progressió apareixen expansions de la clona trisòmica. A més, l'adquisició de +12 es podria relacionar amb transformació a síndrome de Richter (Hjalmar *et al.* 2001). La regió crítica involucrada en la patogènesi de la LLC amb trisomia 12 es desconeix degut a que rarament s'identifiquen trisomies parcials. Les bandes cromosòmiques 12q13-q22 semblen ser la regió mínima duplicada equivalent a la trisomia completa i inclou els gens *GLI* i *MDM2*, aquest últim codificant d'una proteïna d'unió i inactivació de P53 (Chena *et al.* 2000).

- Pronòstic: Estudis inicials atorgaven un pronòstic intermedi amb una SG de 114 mesos. En estudis més recents, encara que aquests pacients tenen una supervivència lliure de progressió més curta, la SG és molt favorable (per revisió Zenz *et al.* 2011).

1.4.3.7.2.3. Deleció 11q23(ATM)

La deleció 11q23 s'identifica en el 18% dels casos amb LLC, sovint en pacients més joves que la mitjana, presentant importants adenopaties i ràpida progressió. Les delecions de 11q s'observen freqüentment en altres tipus de leucèmies; en la LLC, afecta a una regió consens mínima on es localitza el gen *ATM* (*Ataxia telangiectasia mutated*) i en alguns casos és crítica. En 1/3 part dels casos, va acompanyada de mutacions del gen *ATM* en l'altre al·lel, produint-se una inactivació bial·lèlica del gen. *ATM* és una proteïna d'activitat cinasa amb un paper en la reparació dels danys de l'ADN, induïble per trencaments cromosòmics de doble cadena que succeeixen de

forma espontània o per l'exposició a agents genotòxics (**figura 17**). L'ATM protegeix la integritat de l'ADN via P53, aturant el cicle cel·lular, activant les vies de reparació de l'ADN, i si el dany causat és irreparable, induint l'apoptosi (Stankovic *et al.* 2002; per revisió Zenz *et al.* 2010). A més fosforila altres proteïnes com MDM2, regulador de P53. La inactivació d'ATM provoca una disfunció de la via P53 (Eclache *et al.* 2004). Les delecions d'ATM rarament s'associen a translocació (Mayr *et al.* 2006; Dicker *et al.* 2006; Herholz *et al.* 2007).

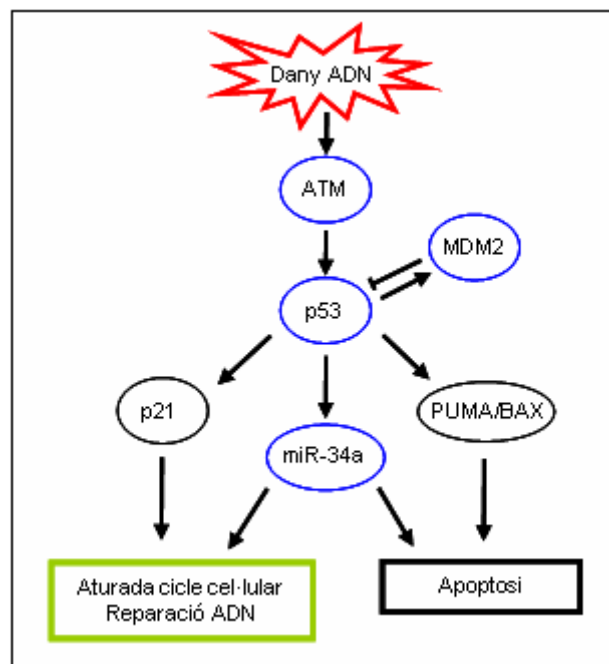


Figura 17. Via de resposta al dany de l'ADN mediada per ATM i p53.

- **Pronòstic:** generalment els pacients presenten una SG curta (79 mesos) però a més, un percentatge >40% de cèl·lules 11q- s'associa a pitjor supervivència (Hernandez *et al.* 2011). Els pacients amb la delecio 11q23 i mutacions d'ATM tenen una SG més curta que els que únicament presenten la delecio. S'ha descrit que pacients amb mutacions d'ATM estan associats a IGHV no-mutats (Austen *et al.* 2005; per revisió Schnaiter *et al.* 2011). Els tractaments actuals amb fludarabina + ciclofosfamida + rituximab semblen ser particularment beneficiosos en aquests pacients millorant el pronòstic (Hallek *et al.* 2010; per revisió Zenz *et al.* 2011).

1.4.3.7.2.4. Deleció 17p13(P53)

La deleció de 17p13 produeix la pèrdua del gen supressor de tumors *P53* (*tumor protein 53, TP53*). La funció d'aquest gen és aturar el cicle cel·lular i induir l'apoptosi. Es troba present en el 3-8% de pacients al diagnòstic, però la incidència pot incrementar-se fins el 30% en recaiguda. Generalment, la deleció de *P53* és deguda a la pèrdua total del braç curt del cromosoma 17 com única anomalia o per translocacions no equilibrades com el dic(17;18)(p11.2;p11.2) (Espinet *et al.* 2000; Fink *et al.* 2006; Mayr *et al.* 2006; Woyach *et al.* 2010). Aquesta darrera és una anomalia recurrent en la LLC que s'associa a cariotip complex, així com la trisomia 12 i *IGHV* no-mutat i, es de ràpida evolució. Entre 17p10~17p12 s'han descrit punts calents de trencament de l'ADN amb regions riques en LCR (*low copy repeats*). Les LCR són regions repetides de 10-400Kb amb el 95-97% d'homologia entre elles que tendeixen a situar-se en zones centromèriques i telomèriques. Les LCR palindròmiques són propenses a formar bucles en l'ADN que per errors d'alineació durant la replicació, poden donar lloc a recombinacions intracromosòmiques com en el cas del isocromosoma 17, o entre cromosomes no homòlegs com el dicèntric (17;18) (Fink *et al.* 2006).

- Anomalies associades: els casos amb deleció de *P53* acostumen a presentar alta inestabilitat cromosòmica o un cariotip complex, fent pensar en altres possibles candidats addicionals responsables de la patologia. Mitjançant estudis de CGH arrays s'observen altres anomalies associades com l'amplificació de 2p, la deleció a 6q, 18p i 20p (Rudenko *et al.* 2008).

- Via de resposta al dany: la proteïna p53 té un paper central en aquesta via (**figura 17**). El dany en l'ADN és reconegut per ATM i p53 s'activa. En aquest moment p53 pot aturar el cicle cel·lular per tal de reparar l'ADN a través de la proteïna p21 o induir l'apoptosi a través de PUMA/BAX. A més, p53 és regulada negativament per MDM2 la qual, en absència de dany, degrada p53 permetent que el cicle cel·lular avanci. Recentment s'ha observat que pacients amb deleció/mutació de *P53* tenen baixa

expressió del miR-34a (mapat a 1p36) i es relaciona amb la inactivació de la resposta al dany de l'ADN via p53, resistència al tractament i evasió de l'apoptosi. Inclús els pacients sense anomalies de *P53* però refractaris al tractament mostren nivells baixos de miR-34a (Zenz *et al.* 2009a; Zenz *et al.* 2009b). Serà important discernir el paper dels miRNAs particularment en els que són dependents de la via p53 (Zenz i Stilgenbauer 2010; Zenz *et al.* 2010).

- Pronòstic: els pacients amb 17p- tenen un pronòstic desfavorable amb una SG de 32 mesos (Dohner *et al.* 2000) però l'evolució d'aquests pacients s'ha vist modulada en funció de la mida de la clona tumoral i la presència de mutacions de *TP53* de l'altre al·lel.

- Mida de la clona tumoral: s'ha observat que els pacients que per I-FISH presenten >20% de cèl·lules delecionades mostren una evolució més desfavorable que els que tenen la delecio en el 5-20% (Catovsky *et al.* 2004; Catovsky *et al.* 2007; Rudenko *et al.* 2008). Altres estudis corroboren aquests resultats i mostren que els pacients amb >25% de cèl·lules anòmales i que la delecio sigui adquirida durant el curs de la malaltia té pitjor pronòstic que si és *de novo* i present en <25% de cèl·lules (Delgado *et al.* 2012).

- Mutacions en l'altre al·lel: altres autors assenyalen que més que la mida de la clona tumoral, les mutacions en l'altre al·lel són les responsables de l'evolució (Rudenko *et al.* 2008). En un 80-90% dels casos, la delecio a 17p es presenta amb mutacions de *TP53* de la còpia restant (per revisió Zenz *et al.* 2011). El mal pronòstic és conseqüència de la inactivació completa de la via supressora de tumors, per delecio d'un al·lel més mutació en l'altre al·lel. Un 4-15% dels pacients no tractats en estadis inicials de la malaltia presenten mutacions de *TP53*, associant-se a mal pronòstic i a alteracions genètiques de major complexitat. Durant el tractament, hi ha una selecció clonal de les cèl·lules que també presenten mutacions de *TP53* i en estudis posteriors al tractament, s'observa un increment de cèl·lules amb delecio i mutacions de *TP53* (Zenz *et al.* 2008). La supervivència en els 3 grups de pacients amb: del(17p13) com a

única anomalia, només mutacions de *TP53*, i del(17p13) més mutacions de *TP53* és similar, essent baixa (per revisió Zenz *et al.* 2011). Probablement, algunes mutacions de *P53* tenen una activitat oncogènica per si mateixes i participen activament en la transformació (Soussi i Lozano 2005).

- Resistència al tractament: *P53* es troba inactiu en el 50% de càncers humans i la proteïna p53 és essencial per la cèl·lula en la resposta a genotòxics, d'aquí que les alteracions de *P53* són un component important en la resistència a la teràpia. És de vital importància en la LLC la identificació de la deleció 17p13 degut al seu mal pronòstic i a la refractarietat als tractaments convencionals amb anàlegs de purines com la fludarabina, de gran eficàcia en altres LLC i síndromes limfoproliferatives (Dohner *et al.* 1995), i a agents alquilants o anticossos monoclonals com anti-CD20 Rituximab (Byrd *et al.* 2003). La combinació de quimioimmunoteràpia fludarabina - ciclofostamida - rituximab sembla millorar en part el curs d'aquests pacients (Hallek *et al.* 2010; Delgado *et al.* 2012) però altres tractaments alternatius com l'anticòs anti-CD52 Alemtuzumab (Campath) semblen tenir els millors resultats en pacients 17p-refractaris al tractament arribant a la remissió completa (Stilgenbauer i Dohner 2002; Zenz *et al.* 2009). Són necessaris altres tractaments que actuïn independentment de la via de p53 i s'ha de considerar el transplantament al·logènic en aquests casos refractaris (Mougalian i O'Brien 2011; per revisió Zenz *et al.* 2011).

- Evolució: al voltant del 13% dels pacients de LLC evolucionen i es transformen a limfoma difús de cèl·lula gran per un procés anomenat Síndrome de Richter. Es dona una transformació agressiva de ràpida progressió i pronòstic desfavorable amb supervivència mitjana de 12 mesos (per revisió Montserrat i Moreno 2009). El 60% de síndromes de Richter tenen anomalies al gen *TP53* (Chena *et al.* 2002). Les translocacions de 14q32 i determinats reordenaments de *IGHV* també s'associen en més freqüència.

1.4.3.7.2.5. Translocacions

Combinant les tècniques de CC i FISH s'identifiquen translocacions en el 34-42% dels casos i poden ser tant equilibrades com no equilibrades. Sovint les translocacions involucren a 13q14 i 17p13 amb l'aparició de delecions submicroscòpiques com a conseqüència dels trencaments (Mayr *et al.* 2006; Van Den Neste *et al.* 2007). A diferència d'altres leucèmies, les translocacions equilibrades recurrents són rares en la LLC i les que impliquen el gen *IGH* són molt poc freqüents, i en cas de ser observades, s'ha de reconsiderar si el diagnòstic és de LLC o tractar-se d'una altra neoplàsia limfoide amb expressió perifèrica (per revisió Stilgenbauer i Dohner 2004). Dins d'aquestes darreres, les més freqüents són la $t(14;18)(q32;q21)/BCL2$ i la $t(14;19)(q32;q13)/BCL3$ que es pot observar en un subtipus de aLLC de curs agressiu. Aquestes dues translocacions presenten punts de trencament diferents respecte el limfoma fol·licular i la LLA-B. S'han descrit també translocacions variants de *BCL2* amb els locus de les cadenes lleugeres *IGL* localitzats en els cromosomes 2 i 22 (Haferlach *et al.* 2007). Les translocacions dels gens *IGH* i *IGL* es produeixen per errors durant els processos de recombinació dels segments VDJ o *switch*.

- *Pronòstic*: acostumen a presentar una SG inferior que els pacients q no presenten translocacions (Mayr *et al.* 2006; Van Den Neste *et al.* 2007).

1.4.3.7.2.6. Evolució clonal

L'evolució clonal o adquisició de noves lesions cromosòmiques durant el curs de la malaltia és deguda a una selecció clonal de cèl·lules tumorals resistents al tractament. En un primer moment, es creia que era poc freqüent degut al baix nombre d'estudis realitzats. Més recentment, mitjançant estudis de FISH en diferents moments de la malaltia, s'ha observat que el 27% dels pacients amb més de 5 anys de seguiment adquireixen alteracions cromosòmiques com: delecions 13q monoal·lèliques, evolució a 13q- bial·lèlica, 17p-, 6q-, 11q-, i guanys de 8q, mentre que l'estat mutacional *IGHV* roman estable com en el diagnòstic (Shanafelt *et al.* 2006; Stilgenbauer *et al.* 2007).

Els casos amb *IGHV* mutats són més propensos a adquirir alteracions de pronòstic favorable (13q-), mentre que en els *IGHV* no-mutats adquireixen alteracions de pronòstic desfavorable (17p- i 11q-). A més, els casos amb positivitat del marcador ZAP-70 (*z-chain associated protein 70kDa*) tenen més tendència a l'evolució clonal. També es poden observar variacions significatives en el percentatge de cèl·lules anòmales respecte al diagnòstic, com increment o disminució de la població clonal o la desaparició de la clona tumoral en els pacients tractats. Els estudis de I-FISH avaluant la importància del percentatge de cèl·lules tumorals anòmales són cada cop més habituals, i s'ha establert que determinats percentatges de cèl·lules anòmales indiquen diferents estadis evolutius (Catovsky *et al.* 2004).

1.4.3.8. Factors pronòstic

La supervivència mitjana dels pacients amb LLC és de 10 anys. S'associen a mal pronòstic diferents paràmetres clínics com: els estadis III-IV de Rai o C de Binet, un temps de duplicació limfocitari <12 mesos o un patró difús en MO, paràmetres sèrics com: la β_2 -microglobulina elevada o una timidina cinasa elevada, i factors genètics com algunes alteracions citogenètiques, l'estat i reordenaments de *IGHV*, l'expressió de CD38 i ZAP-70 (Mougalian i O'Brien 2011).

- Anomalies citogenètiques

Les alteracions cromosòmiques identificades per I-FISH són un factor pronòstic independent predictiu de progressió, supervivència i resposta al tractament des que a l'any 2000 Döhner *et al.* van proposar un model jeràrquic basat en les categories citogenètiques 17p-, 11q-, +12, cariotip normal i 13q- com anomalia única (**figura 18**). La SG per a cada categoria es va estimar en 32 mesos, 79 mesos, 114 mesos, 111 mesos i 133 mesos, respectivament. Les delecions 11q i 17p van mostrar més signes de progressió, i aquesta última amb una SLT més curta (**figura 18, dreta**), i la delecio 13q amb una SG més llarga (**figura 18, esquerra**) (Dohner *et al.* 2000).

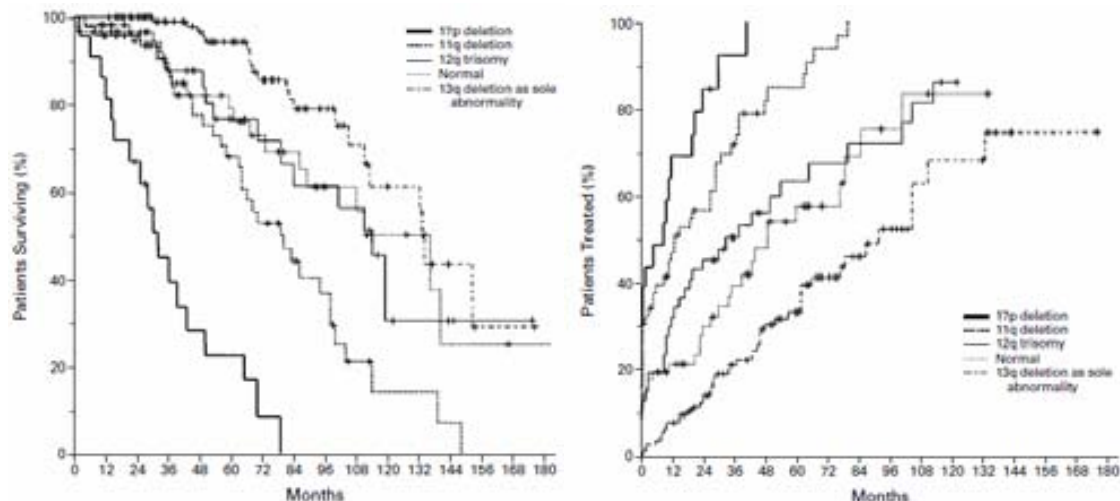


Figura 18. Corbes de supervivència i tractament en la LLC (Döhner *et al.* 2000).

Tot i així, altres factors ja mencionats com la proporció de cèl·lules tumorals, la mida de la deleció, etc, estan cobrant valor pronòstic en l'actualitat i, l'evolució clonal s'ha considerat com un factor pronòstic independent. A més, pacients amb I-FISH normal de pronòstic relativament favorable, poden presentar altres alteracions en el cariotip conferint un pitjor pronòstic (Rigolin *et al.* 2012). L'avenç dels nous tractaments estan igualant el curs clínic de les diferents categories citogenètiques, a excepció de la deleció *TP53*.

- Estat mutacional *IGHV* i reordenaments VDJ

L'estat mutacional *IGHV* és un dels factors pronòstic més importants en la LLC ja que defineixen dues entitats biològiques amb comportaments clínics ben diferenciats. Els casos *IGHV* no-mutats s'associen a progressió de la malaltia i tenen una supervivència curta de 79 mesos, en canvi els mutats tenen una progressió lenta i una supervivència de 152 mesos (Hamblin *et al.* 1999; Krober *et al.* 2002).

- Relació entre l'estat mutacional i les alteracions cromosòmiques

S'ha correlacionat l'estat mutacional amb les anomalies cromosòmiques identificades per I-FISH. Les alteracions de pronòstic desfavorable 17p- i 11q- apareixen casi exclusivament en els casos no-mutats mentre que les alteracions de pronòstic favorable 13q- es troben en més freqüència en els casos mutats (**taula 10**) (Krober *et*

al. 2002). En ambdós grups, la incidència d'anomalies és similar però es detecten aberracions més complexes en els no-mutats (Karhu *et al.* 2003).

Taula 10. Alteracions cromosòmiques en relació a l'estat mutacional *IGHV* en la LLC (Kober *et al.* 2002).

Alteració	Mutat (44%)	No-mutat (56%)
Clonals	80%	84%
del(13q14)	65%	48%
del(13q14) única	50%	26%
+12	15%	19%
del(11q23)	4%	27%
del(17p13)	3%	10%
del(17p13) o del(11q23)	7%	35%

Les translocacions (bàsicament les no equilibrades) s'associen a *IGHV* no-mutats, i les translocacions equilibrades i cariotips amb 3 o més alteracions que s'associen a l'expressió de CD38, de mal pronòstic (Dicker *et al.* 2006; Haferlach *et al.* 2007).

Els reordenaments dels segments VDJ del gen *IGH* que es troben en els pacients amb LLC són diferents als que es troben en una persona sana. Donada la gran possibilitat de combinacions dels segments, no seria esperat trobar dos casos estructuralment semblants però, els BCR de diferents pacients són de vegades estructures molt similars (per revisió Chiorazzi *et al.* 2005). El segment V1-69 és més freqüent en les LLC no-mutades i el V4-34 és el més comú en les mutades (per revisió Shanafelt *et al.* 2010). En quant a la presència en línia germinal del V3-21 s'ha aboservat que confereix per si mateix un pronòstic desfavorable independent de l'estat mutacional del gen *IGHV* (per revisió Montserrat i Moreno 2009).

- Marcadors tumorals CD38 i ZAP-70 i relació amb l'estat mutacional *IGHV*

CD38 és un marcador indicador d'activació i proliferació, i ZAP-70 és un marcador del limfòcit T que rarament es presenta en cèl·lules B normals però que apareix en limfòcits B de la LLC. L'expressió de CD38 >30% o de ZAP-70 >20% s'associen a mal pronòstic (Mougalian i O'Brien 2011). Una expressió elevada de ZAP-70 s'associa a major inestabilitat cromosòmica i major risc d'evolució amb un curs més agressiu (Shanafelt *et al.* 2006; Stilgenbauer *et al.* 2007). Kröber *et al.* van comparar l'estat

mutacional amb l'expressió del marcador CD38 i s'observa que l'elevada expressió de CD38 es correlaciona amb *IGHV* no-mutats i la baixa expressió de CD38 amb *IGHV* mutats, però amb discrepàncies en una tercera part dels casos possiblement degut a canvis d'expressió de CD38 durant el curs de la malaltia (Krober *et al.* 2002). L'expressió de ZAP-70 i CD38 s'ha relacionat també amb l'estat mutacional *IGHV* i s'han observat dos grups amb diferent curs clínic. Els pacients amb *IGHV* no-mutat, CD38+ o ZAP-70+ tenen una evolució molt agressiva, mentre que els pacients amb *IGHV* mutat, CD38- o ZAP-70- tenen una evolució indolent (per revisions: Chiorazzi *et al.* 2005; Schnaiter *et al.* 2011).

1.4.4. NEOPLÀSIES DE CÈL·LULES PLASMÀTIQUES

Dins la classificació de les neoplàsies de CP es troba la gammapatia monoclonal de significat incert (GMSI) de la qual es fa menció breument, i el mieloma de CP o mieloma múltiple (MM) que es tracta en detall, entre altres.

1.4.4.1. GAMMAPATIA MONOCLONAL DE SIGNIFICAT INCERT

La GMSI és una neoplàsia de CP que es caracteritza per la presència de proteïna M (també anomenada paraproteïna o proteïna monoclonal) en sèrum <30g/L, <10% de CP en MO i absència símptomes relacionats amb danys orgànic o tissular "CRAB" hiper \underline{c} alcèmia, insuficiència \underline{r} enal, \underline{a} nèmia i lesions òssies (*bone lesions*). El risc de progressió a altres hemopaties en els pacients amb GMSI és del 1% per any i la tercera part progressen a MM. Es considera com una entitat prèvia al MM (Landgren *et al.* 2009b). L'existència de les paraproteïnes IgG i IgA indiquen un risc de progressió a MM. La presència de la paraproteïna IgM rarament s'associa a la transformació a MM però, s'associa a la macroglobulinèmia de Waldenström i altres processos limfoproliferatius. Habitualment les GMSI mostren un cariotip normal, però per FISH

s'identifiquen les mateixes alteracions que en el MM encara que en menor proporció (Avet-Loiseau *et al.* 1999c).

1.4.4.2. MIELOMA MÚLTIPLE

El MM és una neoplàsia de CP monoclonals en la MO associada a nivells elevats de paraproteïna en sèrum o orina. Es pot manifestar de forma asimptomàtica o amb un curs agressiu degut a dipòsits de cadenes de les Ig en òrgans i teixits. Els criteris diagnòstics del MM simptomàtic s'estableixen per la presència de >10% de CP clonals en MO, proteïna M en sèrum >30g/L IgG o >25g/L IgA, o >1g/24h en orina, i signes relacionats amb dany orgànic o tissular "CRAB" (WHO 2008; Dimopoulos *et al.* 2011).

La CP acostuma a ser gran, oval, amb nucli rodó excèntric de cromatina en "roda de carro" sense nuclèol i citoplasma abundant basòfil. La cèl·lula tumoral deriva de la CP de llarga vida que ja ha passat pel centre germinal i patit les hipermutacions somàtiques i canvi d'isotip o *switch*, mecanismes considerats normals.

Segons la classificació de la WHO, el mieloma de CP se situa dins les neoplàsies de CP, i dins s'aquest s'identifiquen les variants: simptomàtica (o MM), MM quiescent o asimptomàtic (MMA), MM no-secretor i la leucèmia de CP (LCP).

S'han descrit casos de MM amb coexistència d'altres hemopaties malignes com la LLC (Chang *et al.* 2004b), així com amb síndromes mielodisplàsiques (SMD) i LAM ambdues relacionades amb el tractament. La identificació de les alteracions del(13q) com única anomalia, i delecions o monosomies dels cromosomes 5 o 7 entre d'altres, han de suggerir la presència d'una SMD secundària al tractament (Dewald *et al.* 1985; Slovak *et al.* 2005).

1.4.4.2.1. Epidemiologia

El MM representa el 10-15% de les neoplàsies hematològiques, essent la segona més freqüent en Estats Units i Europa, amb una incidència de 4/100.000 habitants i 20.000

casos nous per any. És una malaltia més comú en homes que en dones (1,4:1), més freqüent en afroamericans i menys en asiàtics (WHO 2008; Landgren i Weiss 2009). És una patologia d'edat avançada amb una edat mitjana de presentació de 67 anys (Blade *et al.* 2010; per revisió Slovak 2011).

1.4.4.2.2. Etiologia

La causa que origina el MM es desconeix, però en part s'associa a factors genètics i familiars. Tenir antecedents familiars de neoplàsies limfoproliferatives fan augmentar el risc de patir el MM i és 3,7 vegades superior entre parents de primer grau. Altres estudis en bessons amb MM suggereixen l'existència de factors genètics importants en l'etiologia del mieloma (Lynch *et al.* 2001). Com s'ha mencionat, la GMSI es pot considerar una fase prèvia al MM. Algunes estimulacions antigèniques cròniques per infeccions o exposicions a substàncies tòxiques com pesticides o radiacions s'han associat al desenvolupament del mieloma (Landgren *et al.* 2009a).

1.4.4.2.3. Manifestacions clíniques

- MM: es manifesta per dany orgànic "CRAB". La majoria dels casos al diagnòstic presenten fractures o osteoporosi causat per la hipercalcèmia. La insuficiència renal es deu a la proteïnúria de cadenes lleugeres i l'anèmia apareix per la substitució de la cel·lularitat normal en la MO. Requereix de tractament immediat. El *International Myeloma Working Group* (IMWG) estableix els criteris dels diferents estadis del mieloma (Dimopoulos *et al.* 2011).
- MMA: aquesta variant presenta >30g/L de paraproteïna en sèrum i/o >10% de CP en MO i absència de signes "CRAB". També és considerat una fase premaligna del MM i el risc de progressió a MM és del 10% (per revisió Kyle *et al.* 2010).
- MM no-secretor: es caracteritza per la incapacitat de secretar les Ig. La majoria presenten proteïna M citoplasmàtica, però alguns no la sintetitzen.
- LCP: és la neoplàsia de CP de curs agressiu i curta supervivència que presenta

>2x10⁶/mL de CP en SP i representen el 20% dels leucòcits. Els MM IgD i IgE tenen més tendència a la leucemització. La simptomatologia és semblant al MM però són menys freqüents les lesions òssies i més sovint apareixen adenopaties, organomegàlies i insuficiència renal.

Els 60% dels mielomes presenten paraproteïna IgG, el 24% IgA, el 11% només produeixen cadena lleugera, el 3% IgD i un 2% són d'altres isotips o són biclonals (**taula 11**). L'isotip IgG és més freqüent entre els mielomes sense translocacions cromosòmiques. Els mielomes amb paraproteïna IgA presenten amb més freqüència la t(4;14)(p16;q32) i els IgD, IgE, i IgM la t(11;14)(q13;q32). Els reordenaments dels segments VDJ més freqüents en les CP normals són el V3-30 i V3-23. En les CP tumorals també són preferentment el V3-30 i V3-23, i el V5-51 i V1-69 (per revisió Gonzalez *et al.* 2007).

Taula 11. Paraproteïnes i característiques associades en les neoplàsies de CP i reordenaments VDJ més freqüents.

	IgG	IgA	IgD	IgE	IgM	Cadena lleugera
Freqüència	60%	24%	3%	1%	1%	11%
Progressió GMSI-MM	x	x				
Progressió MM-LCP			x	x		
Translocacions		t(4;14)	t(11;14)	t(11;14)	t(11;14)	
Reordenaments VDJ						
CP normals	V3-30	V3-23				
CP tumorals	V3-30	V3-23	V5-51	V1-69		

1.4.4.2.4. Immunofenotip

Les CP tumorals són CD138+, CD38+ dèbil, CD19- i CD56+/- . L'expressió de CD19 s'associa a CP reactives i el CD56- és més freqüent en la LCP.

1.4.4.2.5. Mecanisme oncogènic

La transformació a MM és un procés multifàsic on es troben dues entitats premalignes com la GMSI i el MMA (per revisió Kyle *et al.* 2010). Es creu que el mecanisme patogènic s'inicia per la transformació d'una cèl·lula plasmablàstica del centre germinal. Les cèl·lules filles migren a la MO per madurar i diferenciar-se a CP secretora de Ig. Per errors en els mecanismes de recombinació de l'ADN durant la maduració del limfòcit i l'adquisició de lesions gèniques s'afavoreix la transformació maligna de les CP desregulant el desenvolupament normal d'aquestes (per revisions: Chen-Kiang 2005; Liebisch i Dohner 2006; Gonzalez *et al.* 2007). Encara que han hagut diferents hipòtesis al llarg dels anys, en el procés multifàsic de transformació del MM es creu que existeixen dues vies mielomagèniques que es donen en els estadis inicials premalignes (**figura 19**) (Avet-Loiseau *et al.* 1999c; Fonseca *et al.* 2001a; Avet-Loiseau *et al.* 2002; Fonseca *et al.* 2003). La transformació de CP normal a la CP de la GMSI o MMA es pot donar per hiperdiploïdies (trisomies) o per alteracions no hiperdiploides (bàsicament translocacions en les que esta implicat el gen *IGH*). Adquirida l'alteració primària, la progressió des de la GMSI a MM s'associa a l'addició de la monosomia 13 i a LCP per un increment d'altres d'alteracions secundàries com la deleció de 17p i alteracions del cromosoma 1 entre d'altres (Chang *et al.* 2005b).

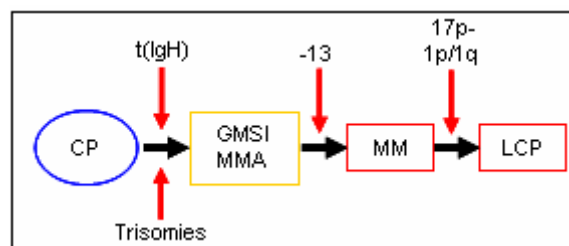


Figura 19. Procés oncogènic multifàsic del mieloma.

1.4.4.6. Alteracions citogenètiques

Utilitzant conjuntament les tècniques de CC i FISH en CP es poden identificar fins el 90% de casos amb anomalies (Dewald *et al.* 2005). La heterogeneïtat clínica del MM també es reflexa en la complexitat citogenètica en aquests pacients. Les alteracions

cromosòmiques primàries es poden classificar en cariotips hiperdiploides i no-hiperdiploides. Les anomalies numèriques es presenten en el 40-60% dels pacients i habitualment els cariotips són hiperdiploides (amb trisomies) o pseudodiploidies (amb monosomies), però també s'identifiquen cariotips hipodiploides i propers a la tetraploidia (Fonseca *et al.* 2003; Wulleme *et al.* 2005).

El casos restants presenten alteracions estructurals on recurrentment apareixen translocacions de *IGH*(14q32). En els casos amb progressió de la malaltia s'afegeixen alteracions secundàries en la transformació com guanys d'1q, delecions d'1p, 13q i 17p, alteracions de 8q i cariotips complexes (Fonseca *et al.* 2009; per revisions: Higgins i Fonseca 2005; Avet-Loiseau 2007; Slovak 2011).

Malgrat els inconvenients de la tècnica en l'estudi del MM, la CC amb o sense estimulants identifica anomalies cromosòmiques en el 30% dels casos al diagnòstic i fins un 60% en pacients tractats. Les limitacions de la CC en el MM són: la baixa infiltració de CP en algunes MO, la dificultat de les CP en dividir-se, la dificultat en identificar clones, la presència de cariotips normals que deriven de cèl·lules mieloides o que emmascaren anomalies críptiques. Tot i així, les alteracions que s'observen en més freqüència amb la CC són les trisomies dels cromosomes imparells, les monosomies 13, 14, 16 i 22, les translocacions de 14q32, guanys i pèrdues del cromosoma 1, i delecions de 13q, 16q i 22q, així com cariotips complexes (Dewald *et al.* 1985; Sawyer *et al.* 1995; Calasanz *et al.* 1997).

Els avantatges que proporcionen les tècniques de FISH incrementen la detecció d'alteracions gèniques en el 90% dels pacients (Fonseca *et al.* 2004; Dewald *et al.* 2005; per revisió Avet-Loiseau 2007), identificant alteracions en el 35-60% dels casos amb cariotip normal i mostrant translocacions de 14q32, moltes vegades críptica o emmascarada en un cariotip complex, en més de la meitat dels casos (Avet-Loiseau *et al.* 1999a; Konigsberg *et al.* 2000; Harrison *et al.* 2003; Dewald *et al.* 2005; Saez *et al.* 2006).

La recent aplicació de les tècniques de separació de determinats tipus cel·lulars han permès estudiar exclusivament les CP responsables de la neoplàsia. El IMWG recomana la utilització de la I-FISH específicament sobre les CP (Dimopoulos *et al.* 2011; Munshi *et al.* 2011) que es pot realitzar mitjançant 3 tècniques de selecció o identificació de CP:

- Separació immunomagnètica de CP: les CP es marquen amb anticossos anti-CD138 conjugats a partícules magnètiques. Les CP marcades quedaran retingudes en un camp magnètic facilitant la seva separació. Un cop aïllades es realitza la FISH (Avet-Loiseau *et al.* 1999c; Harrison *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005).

- Identificació immunofluorescent de CP: també s'anomena FICTION (*fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation on neoplasm*) o clg-FISH. La tècnica combina la FISH amb el marcatge fluorescent de la cadena lleugera de la IgG o altres marcadors específics de les CP. Així, només el citoplasma o superfície de les CP emeten fluorescència permetent avaluar únicament els senyals de FISH dels nuclis d'aquestes cèl·lules (Weber-Matthiesen *et al.* 1993; Chang *et al.* 2004a; Fonseca *et al.* 2004).

- Tinció morfològica de CP: també s'anomena *target*-FISH (T-FISH) o *May-Grünwald-Giemsa*-FISH (MGG-FISH). Es realitza una tinció morfològica MGG per localitzar les CP i seguidament la FISH sobre la mateixa extensió cel·lular. Posteriorment, s'ha de relocalitzar la posició de les CP per tal d'avaluar els senyals de fluorescència. En aquesta tècnica es requereix d'experiència en citologia (Nickenig *et al.* 2001; Slovak *et al.* 2005; Hartmann *et al.* 2011).

1.4.4.2.6.1. Hiperdiploïdia

Prop de la meitat dels pacients presenten cariotips de 48-74 cromosomes identificant-se trisomies dels cromosomes imparells 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 i 21 en els estadis inicials del procés neoplàsic (Sawyer *et al.* 1995; Calasanz *et al.* 1997; Fonseca *et al.* 2004). Els guanys més freqüents són els dels cromosomes 15, 9 i 5, seguits de la resta.

- Pronòstic: els pacients amb trisomies tenen relativament bon pronòstic, possiblement degut a que tenen còpies extra de determinats gens supressors de tumors (Perez-Simon *et al.* 1998) i a que no acostumen a associar-se a les alteracions estructurals de mal pronòstic (Fonseca *et al.* 2003; Wulleme *et al.* 2005; per revisió Avet-Loiseau *et al.* 2007).

1.4.4.2.6.2. Translocacions implicant al gen *IGH*

Al voltant del 50-75% dels pacients presenten translocacions de *IGH* (14q32), sovint críptiques o emmascarades en un cariotip complex (Avet-Loiseau *et al.* 1999a; Dewald *et al.* 2005). La translocació del gen *IGH* es considera un dels esdeveniments primaris en la transformació a MM ja que també s'observen amb incidència similar en la GMSI i en el MMA. En altres casos s'adquireixen durant l'evolució del MM i progressió a LCP incrementant la seva incidència, com és el cas de la t(8;14)(q24;q32). Aquestes translocacions acostumen a presentar punts de trencament diferents. Les dels estadis inicials de la patologia tenen el punt de trencament en la regió de canvi d'isotip i les que s'adquireixen en estadis més avançats, en una altra regió (Avet-Loiseau *et al.* 2002). Les translocacions s'associen estretament als casos no-hiperdiploides; el 89% dels MM amb translocació presenten cariotips no-hiperdiploides incloent els hipodiploides i propers a la tetraploïdia (Fonseca *et al.* 2003).

S'han descrit al voltant de 20 *partners* diferents, però generalment, les translocacions es donen amb 5 *partners* relacionats amb oncogens de la família de les ciclines, reguladores dels cicle cel·lular. Aquests són: 11q13(*CCND1*) i 6p21(*CCND3*), que desregulen directament les ciclines D1 i D3, respectivament i 4p16(*FGFR3/MMSET*), 16q23(*C-MAF*) i 20q11(*MAFB*) que desregulen indirectament la ciclina D2 (*CCND2*), determinant diferents pronòstics (Moreau *et al.* 2002; Bergsagel *et al.* 2005). És de destacar que aproximadament el 20% de les translocacions implicant al gen *IGH* tenen altres *partners*, 8q24(*C-MYC*) entre ells. També s'han descrit translocacions amb el locus de les cadenes lleugeres *IGL*(22q11) (Saez *et al.* 2006).

Translocacions que desregulen directament les ciclines:

- **t(11;14)(q13;q32)/CCND1-IGH:** és la més freqüent de les translocacions i es presenta en el 15-20% dels pacients amb MM i en el 15-30% dels pacients amb GMSI. Les CP presenten una morfologia limfoplasmacítica i s'associa a la variant oligosecretora i a la presència del marcador CD20, i té més prevalença en el MM amb paraproteïna IgM (Fonseca *et al.* 2004). En la translocació es sobreexpressa *CCND1*, gen codificant de la ciclina D1 (Dewald *et al.* 1985; Fonseca *et al.* 2002a). També s'ha proposat la desregulació del gen *MYEOV* (*myeloma overexpressed gene*) localitzat a la mateixa banda cromosòmica com un altre dels *partners* de *IGH* (Janssen *et al.* 2000). S'ha observat que en una tercera part dels mielomes també es sobreexpressa *CCND1* en absència de la translocació, indicant un paper important en la transformació. Per CC s'observa que aquesta alteració és igual que la present en el limfoma del mantell però amb punts de trencament diferents. En la meitat dels casos s'associa a delecions a 13q i també pot associar-se a hiperdiploïdia.
 - Pronòstic: es considera de pronòstic intermedi però, en la LCP té un curs agressiu i curta supervivència.
- **t(6;14)(p21;q32)/CCND3-IGH:** està present en el 3-5% dels pacients, sobreexpressant el gen codificant de la ciclina D3 (*CCND3*) (Shaughnessy *et al.* 2001). En més de la meitat dels casos s'associa a la delecio 13q o monosomia 13. Existeix la variant t(6;22)(p21;q11) amb el gen *IGL*. És de pronòstic intermedi.

Translocacions que desregulen indirectament les ciclines:

- **t(4;14)(p16;q32)/FGFR3/MMSET-IGH:** es presenta en el 15-20% dels pacients. S'ha descrit en casos diagnosticats de GMSI i MMA però part d'aquests pacients progressen ràpidament a MM simptomàtic. La translocació desregula per sobreexpressió dos gens localitzats en 4p16; el *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*) amb activitat Tyr-K i el gen *MMSET*

(*multiple myeloma SET domain*), ambdós desregulant indirectament la ciclina D2 (*CCND2*) (Chesi *et al.* 1998b; Nakazawa *et al.* 2000). En la t(4;14) s'intercanvia material cromosòmic subtelomèric de difícil identificació per CC, per la qual cosa requereix de FISH per tal d'identificar la translocació críptica (Avet-Loiseau *et al.* 1999a; Dewald *et al.* 2005). El 20% dels pacients no mostren expressió de *FGFR3* i es correlaciona la translocació no equilibrada i pèrdua del cromosoma 14 translocat (Keats *et al.* 2003). En el 80-90% dels casos, la t(4;14) va acompanyada de la del(13q) o -13 (Fonseca *et al.* 2001a; Avet-Loiseau *et al.* 2002). S'associa a l'isotip IgA.

- Pronòstic: és de pronòstic desfavorable (Keats *et al.* 2003; per revisió Avet-Loiseau *et al.* 2007). El transplantament amb cèl·lules mare i inhibidors dels proteasoma (complex de degradació de proteïnes) com el Bortezomib, podrien millorar l'evolució (Avet-Loiseau *et al.* 2010; per revisió Slovak 2011).

- **t(14;16)(q32;q23)/*CMAF-IGH***: està present en el 2-10% dels pacients implicant al gen *C-MAF* (*macrophage activating factor*) codificant un factor de transcripció. La translocació produeix una sobreexpressió de *C-MAF*, que ahora indueix indirectament la sobreexpressió de la ciclina D2 (*CCND2*), donant lloc a una resistència a l'apoptosi (Chesi *et al.* 1998a). La dificultat en detectar la translocació per CC fa necessària la tècnica de FISH per un diagnòstic acurat. En el 92% dels casos s'associa a pèrdues en 13q (Avet-Loiseau *et al.* 2002). L'anomalia es considera de mal pronòstic.
- **t(14;20)(q32;q12)/*MAFB-IGH***: només s'identifica en el 2% dels pacients. De la mateixa manera que la t(14;16) desregula *CCND2*, però a través de *MAFB* (Hanamura *et al.* 2001). També s'associa a la deleció 13q o monosomia 13 (75%) i guanys de 1q (58%).
 - Pronòstic: té un pronòstic desfavorable en el MM però els pacients diagnosticats de GMSI o MMA tenen un curs estable durant anys abans de progressar (Ross *et al.* 2010).

1.4.4.2.6.3. Deleció 13q/monosomia 13

Les alteracions del cromosoma 13 s'identifiquen en el 50% dels pacients mitjançant FISH i només en el 15% dels casos de diagnòstic quan s'estudien per CC. S'ha associat a la transformació de la GMSI al MM ja que s'identifiquen en el 20% de les GMSI i en el 70% dels MM amb antecedents de GMSI. En canvi, en els MM *de novo*, la deleció 13q/monosomia 13 s'observa en el 31% dels casos (Avet-Loiseau *et al.* 1999c; Fonseca *et al.* 2002b). En el 85% dels casos les alteracions del cromosoma 13 són monosomies (Avet-Louseau *et al.* 2000; Fonseca *et al.* 2001b), en el 15% restant són delecions intersticials o delecions terminals més o menys extenses (Shaughnessy *et al.* 2000; Nomdedeu *et al.* 2002). Per aquest motiu nombrosos gens són desregulats i es desconeix una implicació clara a nivell molecular. En les delecions s'inclouen els locus 13q14, 13q21 i 13q32.2 (Shaughnessy *et al.* 2000), i rarament són delecions bial·lèliques (Fonseca *et al.* 2004). Les alteracions de 13q s'identifiquen en totes les variants clíniques del MM però, s'ha observat que s'associen més als casos amb translocació de *IGH* i concretament a les de mal pronòstic t(4;14) i t(14;16), i deleció 17p (Fonseca *et al.* 2001a; Avet-Loiseau *et al.* 2002; Fonseca *et al.* 2003; Chang *et al.* 2004a). La identificació de la deleció/monosomia en els estadis premalignes del mieloma suggereixen que poden ser esdeveniments primaris en la transformació, però la baixa incidència en la GMSI o el MMA suggereix que són alteracions secundàries en la transformació neoplàsica especialment en alguns casos amb translocació 14q32 (Avet-Loiseau *et al.* 1999c; Avet-Loiseau *et al.* 2002; Chiecchio *et al.* 2009).

- Pronòstic: els pacients amb aquestes alteracions acostumen a respondre menys al tractament que els pacients que no les presenten, i tenen una supervivència més curta (Tricot *et al.* 1995; Konigsberg *et al.* 2000; Fonseca *et al.* 2002b). Malgrat que no té especial mal pronòstic si es detecta per I-FISH, és d'alt risc quan s'observa en metafase degut a una proliferació més elevada de les CP, amb pitjor supervivència (Shaughnessy *et al.* 2003; Dewald *et al.* 2005; Chiecchio *et al.* 2006). No s'observen diferències clíniques entre els pacients amb la deleció 13q o monosomia 13.

1.4.4.2.6.4. Deleció 17p

És una alteració poc freqüent en el MM, s'identifica en el 5-10% dels pacients al diagnòstic, però la incidència s'incrementa durant el seguiment de la malaltia com un esdeveniment secundari de progressió, i implica la pèrdua de *P53* (Avet-Loiseau *et al.* 1999b). La deleció ve acompanyada freqüentment de translocacions d'alt risc t(4;14), t(14;16) i t(14;20), alteracions de 13q i amplificacions de 1q21, o d'un cariotip complex amb pèrdua de tot el braç curt del cromosoma 17. Contràriament al que succeeix en les LLC, rarament s'identifiquen mutacions de *TP53* de l'altre l'al·lel. En aquests casos les lesions òssies poden ser més importants que en la resta de pacients.

-Pronòstic: és de les alteracions de pitjor pronòstic en el MM degut a la pèrdua de *P53*, i té un curs agressiu, resistència a tractament i curta supervivència (Chang *et al.* 2005a; per revisió Avet-Loiseau 2007). Els casos que presenten per I-FISH en CP >60% de cèl·lules patològiques s'inclouen en la categoria de risc molt alt (Avet-Loiseau *et al.* 2010).

1.4.4.2.6.5. Alteracions del cromosoma 1

Una tercera part dels pacients presenten anomalies afegides del cromosoma 1 que acostumen a ser pèrdues d'1p i guanys d'1q. La pèrdua d'1p sovint afecta a tot el braç curt del cromosoma però la regió mínima delecionada es localitza entre 1p21-32. Les pèrdues d'1p s'associen a guanys d'1q i a deleció de 17p (Chang *et al.* 2010). La deleció 1p es presenta com anomalia afegida i s'associa a progressió.

Els guanys d'1q s'identifiquen en el 40% dels pacients en el diagnòstic i prop del 70% en el seguiment indicant evolució de la malaltia (Hanamura *et al.* 2006). Els guanys d'1q s'observen en forma de duplicacions o duplicacions en tàndem, amplificacions, isocromosoma 1q, translocacions no balancejades d'1q i translocacions *jumping* (amb diferents *partners* en un mateix pacient) fruit de la inestabilitat cromosòmica de la heterocromatina pericentromèrica dels cromosoma 1 (Jamet *et al.* 2005; Sawyer *et al.* 2005). Els *partners* descrits en les translocacions d'1q són 6q, 8p, 16q, 19q o 17p. La

regió mínima de guany es situa a 1q21 i conté el gen *CKS1B* que s'associa a progressió y curta supervivència.

1.4.4.2.7. Factors pronòstic

El MM és una neoplàsia incurable amb una supervivència mitjana de 2-3 anys en pacients >65 anys i de 5-6 anys en els pacients més joves (Blade *et al.* 2010).

El sistema d'estadiatge de Durie i Salmon (Durie i Salmon 1975) i el *International Staging System* (ISS) (Greipp *et al.* 2005), classifiquen el mieloma en 3 estadis I-III (**taules 12 i 13**). Segons el ISS, la supervivència mitjana s'estima en 62 mesos, 44 mesos i 29 mesos per als estadis I, II i III, respectivament.

Taula 12. Classificació de Durie i Salmon

Estadi	Criteris
I	Hb i calcèmia normals Lesions òssies absents o aïllades Component monoclonal baix: - IgG <5 g/dL - IgA <3 g/dL - Cadena lleugera <4 g/orina 24h
II	No classificable en I ni III
III	Un o més dels criteris: Anèmia Calcèmia >11,5 mg/dL Lesions òssies abundants Component monoclonal: - IgG >7 g/dL - IgA >5 g/dL - Cadena lleugera > 12 g/orina 24h
Subclassificació	A: Creatinina <2 mg/dL B: Creatinina ≥2 mg/dL

Taula 13. Classificació del ISS

Estadi	Criteris
I	β_2 -microglobulina <3,5 mg/L Albúmina ≥ 3,5 g/dL
II	No classificable en I ni III
III	β_2 -microglobulina ≥5,5 mg/L

Les dades citogenètiques són els factors pronòstic més importants en el MM (**taula 14**) (Blade *et al.* 2010). La identificació de qualsevol alteració cromosòmica es va considerar de risc els els primers estudis i la presència de determinades alteracions i d'anomalies afegides es va associar a curta supervivència (Dewald *et al.* 1985). Les alteracions més importants determinants de pitjor pronòstic són les t(4;14), t(14;16) i t(14;20) i la deleció de *P53* (Keats *et al.* 2003; Chang *et al.* 2005a; per revisions: Avet-Loiseau *et al.* 2007; Avet-Loiseau *et al.* 2010).

Taula 14. Alteracions cromosòmiques i pronòstic en el MM.

Pronòstic	Alteració cromosòmica
Favorable	Hiperdiploidia
	t(6;14)(p21)
	t(11;14)(q13;q32)
	Absència d'anomalies de pronòstic desfavorable
Desfavorable	Hipodiploidia
	del(13q)-13 (Si és en metafase)
	Guanys 1q / pèrdues 1p
	Deleció 17p
	t(4;14)(p16;q32)
	t(16;14)(q23;q32)
t(14;20)(q11;q32)	

El IMWG recomana descartar mitjançant FISH aquestes alteracions d'alt risc, així com la detecció de pèrdues d'1p, 13q, guanys d'1q i la t(11;14)(q13q32) (Munshi *et al.* 2011). Cal considerar que la presència de trisomies en pacients amb les alteracions d'alt risc t(4;14), t(14;16), t(14;20) i 17p- semblen tenir un efecte atenuador en la mala evolució (Kumar *et al.* 2012). Com ja s'ha mencionat la del(13q) o -13 presenten diferent pronòstic depenent de la metodologia utilitzada.

També comença a cobrar importància el percentatge de nuclis patològics que s'observen, es dona una pitjor evolució en aquells casos que presenten >50% de nuclis patològics independentment de l'alteració identificada (Dewald *et al.* 2005). També hi ha altres estudis que determinen pitjor pronòstic en funció de l'alteració com és el cas de >70-80% de cèl·lules 13q- o >60% de nuclis amb deleció 17p (Chiecchio *et al.* 2006; per revisió Avet-Loiseau *et al.* 2007). L'administració de nous agents terapèutics com els inhibidors del proteasoma, (Bortezomib) o noves drogues immunomoduladores com el Revlimid poden millorar l'evolució en alguns casos (Harousseau *et al.* 2004) .

1.5. HIPÒTESI

L'estudi citogenètic de les neoplàsies hematològiques és de gran importància en la pràctica clínica des del punt de vista diagnòstic, pronòstic i patogenètic.

A diferència de les proliferacions d'origen mieloide, la identificació d'alteracions citogenètiques en les proliferacions limfoides es més difícil degut en primer lloc al baix índex mitòtic de les proliferacions de cèl·lules madures, en segon lloc a l'obtenció de metafases normals, sovint no corresponents a la clona maligna o per tractar-se d'alteracions submicroscòpiques/críptiques impossibles d'identificar en metafase mitjançant les tècniques de bandeig G, i en tercer lloc per la mala qualitat cromosòmica de les proliferacions agudes limfoides.

Durant les darreres dècades s'han fet importants avenços en el diagnòstic d'aquestes neoplàsies gràcies en part a la utilització de mitògens específics dels limfòcits B i a la separació dels diferents tipus cel·lulars, però principalment, a la utilització de les tècniques de citogenètica molecular. En les proliferacions agudes, la FISH ha identificat noves alteracions, algunes d'elles críptiques, implicant a gens amb importància pronòstica que fins el moment havien passat desapercebudes per la CC. En les proliferacions madures de baix índex mitòtic, la FISH ha permès el diagnòstic sense la necessitat de cèl·lules en divisió. En aquestes proliferacions els resultats amb estimulants cel·lulars no han estat suficientment exitosos fins a l'aplicació de mitògens específics de limfòcits B, però en ocasions els protocols d'estimulació són complicats per a la pràctica diària. Amb els protocols de separació cel·lular per gradient de densitat i la purificació de determinats tipus cel·lulars s'aconsegueix un enriquiment o selecció de les cèl·lules per tal de realitzar un estudi individualitzat de la població responsable de la neoplàsia, però l'estudi es limita a les cèl·lules en interfase.

Amb l'interés de millorar el diagnòstic de les patologies que es desenvolupen al llarg de la limfopoesi B des de la LLA de limfòcits immadurs, passant per la LLC de limfòcits madurs fins el MM de CP, es planteja la hipòtesi de treball de la present tesi que és que mitjançant la utilització de les tècniques d'estimulació cel·lular, separació cel·lular i la FISH o una combinació d'aquestes metodologies, s'incrementa la detecció d'alteracions cromosòmiques amb repercussió clínica.

1.6. OBJECTIUS

1) A la LLA-B:

1.1) Identificar mitjançant les tècniques de citogenètica convencional i FISH alteracions cromosòmiques no descrites prèviament en una serie de pacients.

2) A la LLC:

2.1) Detectar anomalies cromosòmiques mitjançant la I-FISH amb els diferents mètodes de separació de cèl·lules mononuclears per gradient de densitat a sang perifèrica i de cultius de sang perifèrica estimulats amb TPA, i comparar l'efectivitat per a la identificació d'alteracions cromosòmiques d'ambdues tècniques.

2.2) Relacionar les dades clínic-biològiques amb els mètodes de separació de cèl·lules mononuclears per gradient de densitat i de cultius estimulats amb TPA, per determinar com influeixen els diferents mètodes en la supervivència.

2.3) En els pacients amb la deleció 13q14 identificada per I-FISH, realitzar l'anàlisi citogenètica convencional i la FISH en metafase per tal de caracteritzar el tipus de deleció i si aquesta està associada a translocació.

3) En el MM:

3.1) Detectar anomalies cromosòmiques mitjançant I-FISH amb els mètodes de separació immunomagnètica de cèl·lules plasmàtiques per partícules MACS i de cultius de MO amb o sense estimular, i comparar l'efectivitat d'ambdues tècniques valorant el nombre d'anomalies cromosòmiques identificades.

2. MATERIAL I MÈTODES

2.1. Pacients

S'han estudiat mostres de SP o MO de pacients diagnosticats de LLA-B, LLC, MM i GMSI en el diagnòstic o durant el seguiment de la malaltia. A la **taula 15** es mostren els diferents estudis realitzats i algunes dades clínic-biològiques dels pacients així com els mètodes emprats.

Taula 15. Dades clínic-biològiques dels pacients i mètodes emprats en els estudis.

Estudi	Nº pacients	Sexe (H/D)	Edat mitjana (anys)	Diagnòstic	D/S	Mostra	Mètodes	Autors
I	2/150	2/0	15, 16	LLA-B	1/1	MO	C- Bandes G met-FISH	Aventín <i>et al.</i> 2008
II	49	31/18	64(42-80)	LLC	23/26	SP	C+ CMGD Bandes G I-FISH met-FISH	Sánchez i Aventín 2007
III	235	136/99	64(29-88)	LLC	121/114	SP	C+ CMGD I-FISH	Delgado <i>et al.</i> 2010
IV	101	51/50	67(42-87)	LLC	51/50	SP	C+ Bandes G I-FISH met-FISH	No publicat
V	61/221	35/26	68(45-89)	MM (59) GMSI (2)	32/29	MO	C-/± MACS I-FISH	No publicat

LLA-B, leucèmia limfoblàstica aguda B; LLC, leucèmia limfàtica crònica B; MM, mieloma múltiple; GMSI, gammapatia monoclonal de significat incert; D, diagnòstic; S, seguiment; C-, cultiu sense estimular; C+, cultiu amb estimulants TPA; met-FISH, hibridació *in situ* fluorescent metafàsica; I-FISH, hibridació *in situ* fluorescent interfàsica; SP, sang perifèrica; MO, medulla òssia; CMGD, separació de cèl·lules mononuclears per gradient de densitat; MACS, separació immunomagnètica amb partícules MACS.

Els pacients han estat diagnosticats al servei del Laboratori d'Hematologia de l'Hospital de Sant Pau des de l'any 2001, exceptuant un pacient (estudi I) que va ser diagnosticat a l'Hospital Mútua de Terrassa. Els diagnòstics es van realitzar segons criteris morfològics i immunofenotípics establerts per la classificació de la WHO.

2.2. Mètodes

Les tècniques emprades en cadascun dels estudis es mostren esquemàticament a les **figures 20-24**.

Estudi I:

És un estudi prospectiu en el que s'ha analitzat la MO de 150 pacients de LLA-B en els que s'ha realitzat un cultiu sense estimulants i bandes G per l'anàlisi CC (**taula 15, figura 20**). En 2 dels casos es va realitzar met-FISH amb les sondes LSI IGH *Break Apart* i XCP 2 (**taula 16**) per tal d'identificar les dues alteracions no descrites prèviament.

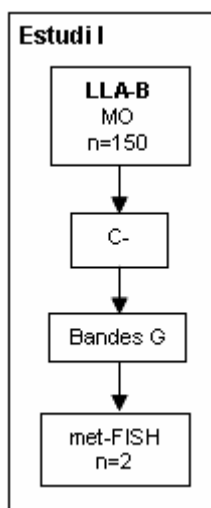


Figura 20. Esquema dels mètodes utilitzats en l'estudi I.

Estudi II:

És un estudi prospectiu en el que s'analitza la SP de 49 pacients de LLC a partir de dues metodologies (**taula 15, figura 21**): la separació de CMGD i l'estimulació amb TPA, i es compara l'eficiència d'ambdues metodologies per a la detecció d'alteracions mitjançant la I-FISH amb les sondes ON ATM(11q22) / SE 11, ON 13q14(D13S272), ON P53(17p13) / SE 17 i ON GLI(12q13) / SE 17, i la sonda ON 13qter en els casos amb deleció 13q14 bial·lèlica com control intern (**taula 16**). També s'ha realitzat la CC o met-FISH per confirmar els resultats de la I-FISH en cultius estimulats amb TPA. A més, s'ha avaluat el recompte de limfòcits absoluts de cada pacient per tal d'establir un valor crític de limfòcits determinant per a la utilització de les diferents metodologies.

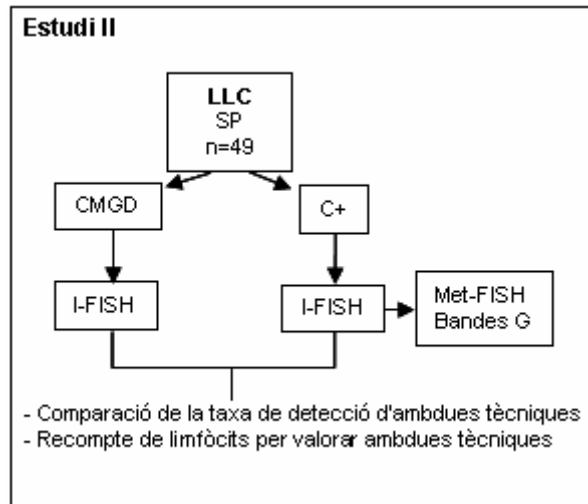


Figura 21. Esquema dels mètodes utilitzats en l'estudi II.

Estudi III:

És un estudi prospectiu a partir de la SP de 235 pacients amb LLC (taula 15, figura 22). En un primer grup inicial de 93 pacients es va realitzar la separació de CMGD i la I-FISH. Posteriorment en un segon grup de 56 pacients es va realitzar la mateixa metodologia que a l'estudi II (incloent 47 dels pacients de l'estudi II).

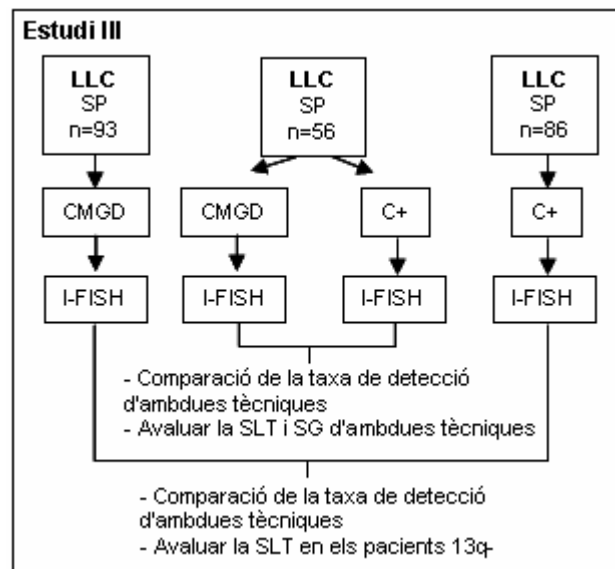


Figura 22. Esquema dels mètodes utilitzats en l'estudi III.

Finalment, en un tercer grup de 86 pacients es va realitzar un cultiu estimulat amb TPA i I-FISH. Les sondes utilitzades en el primer i segon grup de pacients són les mateixes

que a l'estudi II i en el tercer grup es va afegir la LSI 13q14(D13S319), LSI 13q34 i ON DLEU(13q14) / 13qter (**taula 16**). Es van realitzar la comparació de la taxa de detecció de les anomalies cromosòmiques observades mitjançant la I-FISH en els 3 grups de pacients en ambdues metodologies. També s'ha avaluat la importància clínica en la utilització d'aquestes metodologies mitjançant la SLT i SG en el segon grup de pacients, i la SLT en els pacients amb deleció 13q14.

Estudi IV:

És un estudi prospectiu a partir de la SP de 101 pacients amb LLC seleccionats per presentar una deleció 13q14 en la I-FISH (**taula 15, figura 23**). Seixanta dels pacients s'han extret del segon i tercer grup de pacients de l'estudi III. No s'han seleccionat del primer grup de l'estudi III per no tenir cèl·lules en divisió. En tots els pacients s'havia realitzat un cultiu estimulat amb TPA i I-FISH. S'han realitzat les bandes G per l'anàlisi de CC i la met-FISH per tal d'identificar el tipus de deleció. Les sondes utilitzades són la ON 13q14(D13S272) o LSI 13q14(D13S319) i en els casos amb deleció bial·lèlica també s'han utilitzat les sondes sonda ON 13qter, LSI 13q34 o ON DLEU(13q14) / 13qter (**taula 16**).

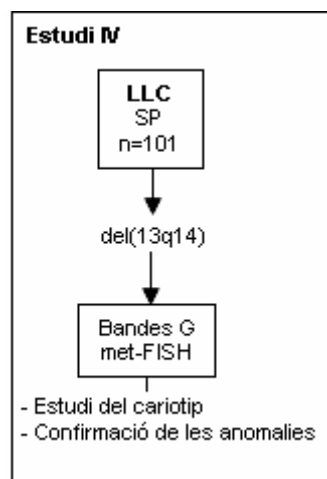


Figura 23. Esquema dels mètodes utilitzats en l'estudi IV.

En els casos amb translocació també s'han utilitzat les sondes TelVysion 1q, ON 1q21 / SRD (1p36), ON FIP-Chic-PDGFRA (4q12), LSI EGR1 / D5S23, D5S721, ON ABL, ON C-MYC (8q24) / SE 8, LSI CDKN2A / CEP 9, WC 1, XCP 2, XCP 10, XCP 13 i XCP 20.

Estudi V:

És un estudi prospectiu a partir de la MO de 221 pacients de MM o GMSI en el que es comparen dues metodologies (**taula 15, figura 24**): la separació de CP amb partícules immunomagnètiques MACS i el cultiu de MO amb o sense estimulants mitjançant I-FISH. Les sondes utilitzades són la ON 13q14(D13S272) o LSI 13q14 (D13S319) i ON 13qter, LSI 13q34 o ON DLEU(13q14)/13qter (**taula 16**). Es van seleccionar 61 pacients amb deleció 13q14 o monosomia 13 per la tècnica de MACS dels quals també es disposava de cultiu de MO sense estimular (45 pacients) o estimulats amb TPA (16 pacients), i es va comparar la taxa de detecció de les anomalies en ambdues metodologies. En tots els pacients, el Servei de Citologia especial de l'Hospital de Sant Pau ha realitzat prèviament un recompte de CP en extensió de MO tenyides amb MGG. Aquest percentatge s'ha relacionat amb el nombre de casos patològics detectats per I-FISH en cultiu de MO estimulats o no.

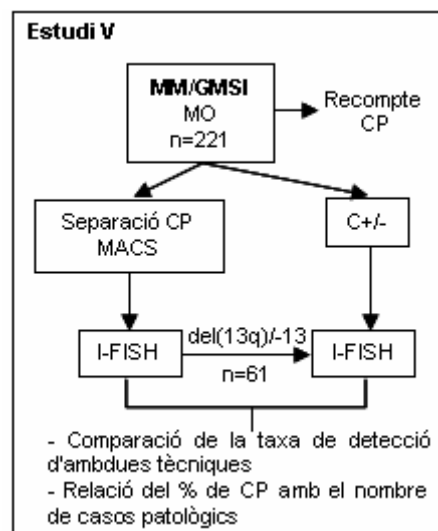


Figura 24. Esquema dels mètodes utilitzats en l'estudi V.

2.3. TÈCNiques DE CITOGÈNÈTICA CONVENCIONAL

2.3.1. *Cultiu cel·lular amb o sense estimulació*

- Realitzar un recompte cel·lular de la SP o MO recollida amb heparina estèril i posar entre $15\text{-}20 \times 10^6$ cèl·lules totals a cultivar en medi RPMI-1640 (Biological Industries, Israel) suplementat amb glutamina i sèrum boví fetal.
- Els cultius sense estimular s'incuben un mínim de 24 h a 37°C amb 5% de CO₂.
- En els cultius estimulats amb el mitògen TPA (50 ng/mL), afegir 200 µL de TPA (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO), i incubar un mínim de 72 h a 37 °C amb 5% de CO₂.
- Per extreure el cultiu, afegir 100 µL de colcemid durant 30 min, fer un xoc hipotònic amb KCl durant 10 min a 37°C, i fixar amb Carnoy (metanol/àc. acètic, 3:1) seguint el protocol estàndard. Realitzar les extensions cel·lulars o guardar el pellet a -20°C fins la seva utilització.

2.3.2. *Bandes G i anàlisi de les preparacions*

- Envellir les extensions cel·lulars un o dos dies a 60°C i tenyir amb tinció de Wright seguint protocols estàndard de bandeig G.
- Localització i captura de les imatges mitjançant un microscopi de camp clar amb els *softwares* Ikaros (MetaSystems, Altlußheim, Germany) o CytoVision (Applied Imaging, Hampshire, UK)
- Les metafases s'han analitzat seguint les recomanacions del ISCN 2009.

2.4. TÈCNiques DE SEPARACIÓ CEL·LULAR

2.4.1. Separació de cèl·lules mononuclears per gradient de densitat

En la LLC:

- Per separar les CMGD s'ha d'afegir 10 mL de SP en 10 mL de medi de separació Histopaque-1077 de densitat 1,077 g/mL (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) a temperatura ambient (TA) i centrifugar 30 min a 2000 rpm, seguint les recomanacions de la casa comercial.
- Recuperar el núvol de cèl·lules mononuclears que apareix a la interfase amb pipeta pasteur i rentar amb solució Hank's (Biological Industries) lliure de calci i magnesi. Centrifugar 10 min a 2000 rpm, i rentar amb Hank's dues vegades més.
- Aplicar un xoc hipotònic amb KCl durant 45 min a 37°C i fixar amb Carnoy.
- Realitzar les extensions cel·lulars o guardar el pellet a -20°C.

En les neoplàsies de CP:

- Afegir 5 mL de MO sobre 4 mL de medi Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) a TA i centrifugar durant 25 min a 1500 rpm.
- Recuperar el núvol de cèl·lules mononuclears que apareix a la interfase amb una pipeta pasteur i rentar amb sèrum fisiològic. Centrifugar durant 10 min a 1800 rpm. Continuar amb el procediment.

2.4.2. Separació immunomagnètica de cèl·lules plasmàtiques amb partícules

MACS

Consta de 3 etapes: separació de CMGD, marcatge immunomagnètic amb partícules MACS anti-CD138 i separació de CP a través de columnes de separació MACS unides a un suport magnètic o imant MACS (**figura 11, pàgina 28**).

1^a etapa - Separació CMGD: Veure apartat anterior.

2^a etapa - Marcatge immunomagnètic de CP amb partícules MACS anti-CD138:

- Treure el sobrenedant, afegir 1 mL de *buffer* MACS i realitzar un comptatge de les cèl·lules.
- Centrifugar la mostra per extreure el *buffer*.
- Afegir 20 µL de partícules magnètiques MACS anti-CD138 (Miltenyi Biotec) específic de CP + 80 µL de *buffer* MACS per cada 10×10^6 /L cèl·lules. En el cas de que tinguéssim $<10 \times 10^6$ cèl·lules, els volums són els mateixos, i en el cas d'obtenir $>20 \times 10^6$ cèl·lules separar la mostra en diferents tubs. Barrejar bé.
- Incubar durant 15 min a 6-12°C en nevera.
- Afegir *buffer* MACS en proporció de 20 vegades el volum de mostra que hi ha al tub i es centrifuga 7 min a 1300 rpm.
- Treure el sobrenedant i afegir 1 mL de *buffer* MACS i procedir a la separació de CP.

3^a etapa - Separació immunomagnètica de CP amb columnes MACS:

- Col·locar una primera columna de separació MACS i un filtre MACS sobre l'imant (Miltenyi Biotec). Deixar passar 500 µL de *buffer* MACS per mullar el filtre i la columna. Evitar que la columna s'assequi.
- Deixar passar la mostra pel filtre i la columna. Afegir 4 vegades 500 µL de *buffer* MACS per netejar la mostra i descartar aquest eluent.
- Treure la columna de l'imant i fer passar 1 mL de *buffer* amb l'èmbol per recuperar les CP en un tub.
- Per augmentar la puresa de les CP, tornar a col·locar una segona columna a l'imant, aquesta vegada sense filtre, mullar-la amb *buffer* MACS, deixar passar la mostra i fer 3 rentats amb 500 µL de *buffer* MACS. Tornar a descartar l'eluent.
- Separar la columna de l'imant i fer passar 1 mL de *buffer* amb l'èmbol per recuperar les CP purificades.

- Centrifugar durant 10 min a 1200 rpm. Treure el sobrenedant.
- Afegir 2 mL d'hipotònic KCl i incubar durant 10 min a 37°C.
- Centrifugar, treure el sobrenedant i fixar el pellet de CP amb Carnoy. Fer les extensions cel·lulars o guardar el pellet a -20°C.

2.5. TÈCNICA D'HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT

a) Preparacions

- Realitzar les preparacions cel·lulars a partir del pellet fixat i comprovar la qualitat dels nuclis/metafases en el microscopi de contrast de fase. Els pellets poden ser de SP o MO amb o sense estimulants, de CMGD i de CP.
- Deixar envellir entre 5-24 h a TA i localitzar i marcar les àrees d'hibridació. Per tal d'eliminar restes cel·lulars i facilitar que penetri la sonda es realitza un pretractament.

b) Pretractament

Quan es realitza la FISH en preparacions amb bandes G, les preparacions es destenyeixen durant 5 min en Carnoy a TA i no es realitzen pretractaments. En els casos de FISH seqüencial tampoc es realitzen pretractaments i les preparacions es destenyeixen durant 5 min en etanol 97%/èter 3% a TA abans de desnaturalitzar.

En els casos de I-FISH en CMGD es van realitzar uns pretractaments amb RNAsa, pepsina i formaldehid, però en la resta de casos, els pretractaments van consisteixen en:

- Incubar les extensions en 2xSSC durant 2 min a 37°C.
- Incubar en una solució de pepsina 0,005%/HCl 0,1N durant 5 min a 37°C.
- Rentar les extensions en 1xPBS a TA durant 3 min en agitació contínua.
- Fixar en formaldehid 1%/1xPBS/MgCl₂ 20 mM a TA durant 10 min.

- Rentar en 1xPBS a TA durant 3 min en agitació contínua.
- Deshidratar les extensions en una sèries d'etanols 70%, 85% i 100% a TA durant 1 min. Deixar assecar a TA.

c) Desnaturalització de les preparacions

- Incubar les preparacions en formamida 70%/2xSSC a $72^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durant 2 min.
- Deshidratar en una sèrie d'etanols 70%, 85% i 95% a -20°C durant 2 min en agitació. Deixar assecar a TA.

d) Desnaturalització de la sonda

S'han utilitzat les sondes de les cases comercials Vysis (Downers Grove, IL, USA, actualment Abbott Molecular), Kreatech (Amsterdam, The Netherlands) i MetaSystems (Altlussheim, Germany) que es mostren a la **taula 16**. En els estudis inicials (I-FISH en CMGD dels estudis II i III) es van utilitzar a més a més les sondes Qbiogene (Carlsbad, CA), que actualment és la casa comercial Kreatech. El protocol que s'ha seguit és el recomanat per la casa comercial i cadascuna té un protocol de desnaturalització diferent:

- Sondes Vysis: barrejar 1 μL de sonda, 2 μL H_2O i 7 μL de *buffer* d'hibridació per cada àrea d'hibridació. Desnaturalitzar a $73^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durant 5 min.
- Sondes Kreatech: aliquotar 10 μL de sonda per àrea d'hibridació. Desnaturalitzar a 90°C durant 10 min.
- Sondes MetaSystems: aliquotar 10 μL de sonda per àrea d'hibridació. Desnaturalitzar a 75°C durant 5 min. Posar en gel breument i incubar durant 30 min a 37°C .

Fer un vòrtex i un pols de centrífuga a totes les sondes i mantenir-les a resguard de la llum fins que s'utilitzin.

Taula 16. Sondes de FISH utilitzades, regió cromosòmica que identifiquen i casa comercial.

Sonda i tipus	Regió cromosòmica	Casa comercial
Telomèrica		
TelVysion 1q	Telòmer 1q	Vysys
LSI 13q34	Telòmer 13q	Vysis
ON 13qter	Telòmer 13q	Kreatech
Locus específica		
ON 1q21 / SRD (1p36)	1q21 / 1p36	Kreatech
ON FIP-Chic-PDGFRA (4q12)	4q12	Kreatech
LSI EGR1 / D5S23, D5S721	5q31 / 5p15.5	Vysis
ON ABL	9q34	Kreatech
LSI 13q14(D13S319)	13q14	Vysis
ON 13q14(D13S272)	13q14	Kreatech
LSI IGH Break Apart	14q32	Vysis
Locus / telomèrica		
ON DLEU(13q14) / 13qter	13q14 / telòmer 13q	Kreatech
Locus / centromèrica		
ON C-MYC (8q24) / SE 8	8q24 / centròmer 8	Kreatech
LSI CDKN2A / CEP 9	9p21 / centròmer 9	Vysis
ON ATM(11q22) / SE 11	11q23 / centròmer 11	Kreatech
ON GLI(12q13) / SE 12	12q13 / centròmer 12	Kreatech
ON P53(17p13) / SE 17	17p13 / centròmer 17	Kreatech
Painting		
WC 1	Painting 1	Kreatech
XCP 2	Painting 2	MetaSystems
XCP 10	Painting 10	MetaSystems
XCP 13	Painting 13	MetaSystems
XCP 20	Painting 20	MetaSystems

LSI, *locus-specific identifier*; ON; *oncology*; SE, *satellite enumeration*; CEP, *chromosome enumeration probe*; WC, *whole chromosome*; XCP, *XCyting paint*.

e) Hibridació

- Aplicar 10 µL de sonda sobre l'àrea d'hibridació marcada. Posar un cobreobjectes de 24x24 mm i segellar amb cola.
- Incubar dins d'una cambra humida a 37°C *overnight* en un forn d'hibridació.

f) Rentats post-hibridació

- Rentar en solució de rentat I a 72°C±1°C durant 2 min.

- Rentar en solució de rentat II a 72°C±1°C durant 1 min.
- Deixar assecar les extensions.

g) Contratinció

- Aplicar 10 µL de DAPI II (4'6-diamino-2-phenylindole) (Vysis) per cada àrea d'hibridació i posar un cobreobjectes de 24x50 mm.
- Deixar en nevera un mínim de 30 min i procedir a l'anàlisi.

h) Anàlisi de les preparacions al microscopi de fluorescència

Les preparacions s'han analitzat al microscopi de fluorescència amb el *software CytoVysion* (Applied Imaging).

I-FISH: s'han avaluat un mínim de 200 nuclis interfàsics de morfologia conservada arrodonida i sense superposicions en cada cas. Els valors de positivitat (*cut-off*) per a cada alteració s'han determinat calculant la $\bar{X}+3SD$ (mitjana aritmètica més 3 vegades la desviació estàndard) del percentatge de nuclis patològics. En la LLC, s'han utilitzat 10 controls de SP i els *cut-off* són iguals en les CMGD i en els cultius estimulats amb TPA. En el MM, s'han utilitzat com a control 5 mostres de MO amb CP reactives i 5 mostres de MM amb CP negatives per a les alteracions a estudiar. Els *cut-off* són diferents en cultius de MO i en CP aïllades per MACS (**taula 17**).

Taula 17. Valors de positivitat per a cada alteració cromosòmica en la I-FISH.

	<i>Cut-off</i> (%)	<i>Borderline</i> (%)
LLC (en CMGD i C+)		
del(11q22)	6	6-10
del(13q14)	7	7-10
de(17p13)	5	5-10
+12	2	2-5
MM		
-13/del(13q14) (en C+/-)	≥11	-
-13/del(13q14) (en CP)	≥20	-

Met-FISH: sempre que s'ha disposat de metafases suficients, s'han avaluat un mínim de 15 metafases de senyal intens, per tal de confirmar els resultats de I-FISH o per identificar altres alteracions de la clona patològica.

Per valorar el tipus de deleció 13q14 de l'estudi IV, s'han considerat els patrons d'hibridació que es mostren a la **figura 25**, on s'observen imatges de met-FISH amb la sonda DLEU(13q14)/13qter (vermell/verd) mostrant un parell de cromosomes 13 normals amb 2 senyals vermells a 13q14 i 2 senyals verds als telòmers, i altres parells amb els diferents tipus de deleció 13q14. El parell de cromosomes amb deleció monoal·lèlica presenta 1 senyal 13q14 vermell i 2 telomèrics verds, i el parell amb deleció bial·lèlica només presenta 2 senyals telomèrics. La deleció submicroscòpica s'emascara en cromosomes de mida aparentment normal i només s'identifica mitjançant met-FISH. La deleció gran pot afectar a varies bandes cromosòmiques i el cromosoma deletzionat és més curt. La deleció associada a translocació s'observa amb diferents morfologies segons el *partner* amb qui s'hagi translocat el cromosoma 13.

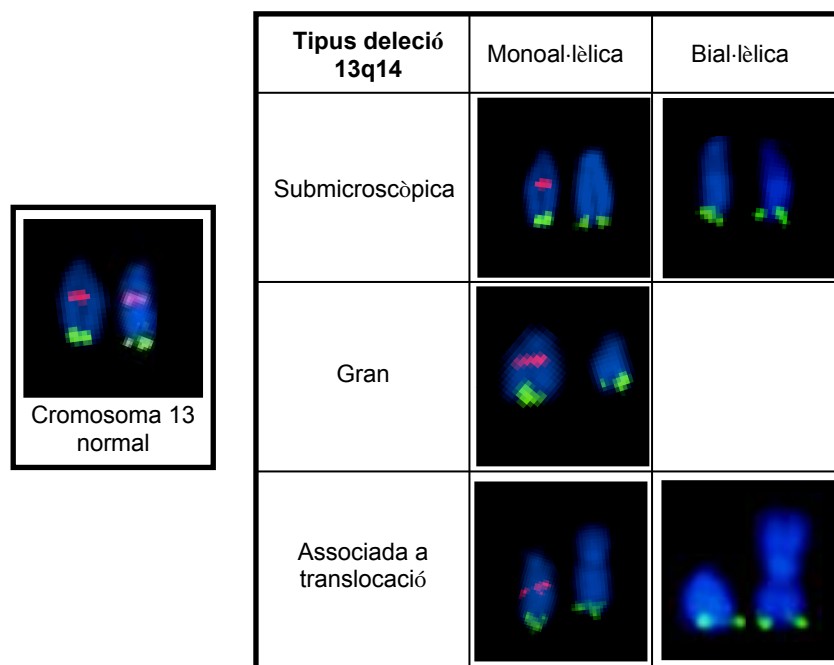


Figura 25. Met-FISH dels parells de cromosomes 13 normals i amb els diferents tipus de delecions amb la sonda DLEU(13q14)/13qter.

2.6. ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi estadística es va realitzar amb el *software* SPSS (Chicago, IL). La significança es va determinar per $P < 0,05$.

- En l'estudi II per comparar el nombre de nuclis patològics observats per I-FISH en CMGD i dels observats en cultiu estimulat amb TPA, s'ha utilitzat el test de *Wilcoxon*. Per identificar el valor crític de limfòcits absoluts determinant per a la utilització de les diferents metodologies s'ha emprat el test *t-Student*.
- En l'estudi III per comparar les característiques dels pacients i factors pronòstic s'ha utilitzat el test χ^2 o el *Kruskal-Wallis*. Els resultats de I-FISH s'han avaluat mitjançant el test de *Fisher*. Per valorar la SG i la SLT s'han utilitzat les corbes de *Kaplan-Meier* i l'efecte de les variables clínico-biològiques es va analitzar amb el *log-rank* test.
- En l'estudi V per comparar els resultats de la I-FISH en cultiu de MO i en CP aïllades s'ha utilitzat la correlació de *Pearson*.

2.7. SOLUCIONS DE TREBALL I MATERIAL INVENTARIABLE

Cultiu

- TPA*:
- Solució stock: dissoldre 1 mg de TPA en 1 mL d'acetona i afegir 9 mL de medi RPMI 1640. Aliquotar en 0,5 mL i congelar.
 - Solució de treball: diluir 0,5 mL de TPA Stock en 19,5 mL de medi RPMI 1640. Aliquotar en 200 μ L i congelar.

Separació immunomagnètica de CP amb partícules MACS

Buffer MACS:

- 250 mL 1xPBS
- 2.5 g albúmina sèrica bovina (BSA)
- 8 mL EDTA 10mg/mL pH 8
- 1XPBS fins a 500 mL. Filtrar amb filtre 0,45 μ m. Guardar en nevera.

FISH

Solució pepsina 0,005%/HCl 0,1N:

50 µL de pepsina 100 mg/mL
100 mL HCl 0,01N

Formaldehid:

1,4 mL Cl₂Mg 1M
7 mL 10xPBS
0,7 mL formaldehid
61,9 mL H₂O destil·lada.

Formamida 70%/2xSSC:

70 mL formamida
10 mL 20xSSC
20 mL H₂O destil·lada. Ajustar a pH 7.

Solució de rentat I (0,4xSSC/0,3%NP40):

20 mL 20xSSC
3 mL NP40 (Vysis)
H₂O destil·lada fins a 1 L. Ajustar a pH 7.

Solució de rentat II (2xSSC/0,1%NP40):

100 mL 20xSSC
1 mL NP40
H₂O destil·lada fins a 1 L. Ajustar a pH 7.

Material inventariable

Els equips que s'han utilitzat són:

- Centrífuga *Jouan BR4i* amb rotor S40 (161 mm).
- Separador de cèl·lules magnètic *MiniMACS Separator* amb suport *MACSMultiStand* (Miltenyi Biotech, Germany) per a la separació de CP.
- Microscopi de contrast de fases *Nikon Eclipse E400*.
- Microscopi de camp clar *Leica DM* connectat a una càmera *IAI Progressive Scan* i el *software* de captura i processament d'imatges *Ikaros* (MetaSystems, Altlußheim, Germany) o microscopi *Nikon Eclipse E400* amb càmera *IAI* i el *software* de captura i processament d'imatges *CytoVision* (Applied Imaging, Hampshire, UK) per a l'anàlisi de les bandes G.

- Microscopi de fluorescència *Nikon Eclipse E400* amb roda de filtres de fluorescència connectat a una càmera *IAI* i el *software* de captura i processament d'imatges *CytoVision* (Applied Imaging, Hampshire, UK) per a l'anàlisi de la I-FISH i met-FISH.

3. RESULTATS

3.1. LLA-B

3.1.1. Identificació de translocacions amb implicació del gen *IGH* no descrites prèviament: t(2;14)(q14.3;q32) i t(14;17)(q32;q21) (Estudi I)

A l'estudi prospectiu de 150 pacients de LLA-B, dos han presentat reorganitzacions del gen *IGH* amb *partners* localitzats a 2q14.3 i 17q21, que no han estat descrits prèviament. En el primer cas, per CC s'observa un cariotip de 47,XY,t(2;14)(q14.3;q32),add(12)(q23),+mar[6]/46,XY[15]. Mitjançant la FISH amb la sonda d'ADN *IGH break-apart* es confirma el reordenament a 14q32 i amb el pintat cromosòmic del cromosoma 2, la implicació d'aquest en la t(2;14)(q14.3;q32). En el segon cas, per CC s'observa un cariotip de 47,XY,+10,t(14;17)(q32;q21)[15]. La FISH amb la sonda *IGH break-apart* confirma la implicació del gen *IGH* en una nova translocació recíproca t(14;17)(q32;q21). En ambdós pacients s'ha realitzat un cultiu de MO sense estimular.

Letter to the editor

Novel *IGHα* translocations, t(2;14)(q14.3;q32) and t(14;17)(q32;q21), in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a clonal disease characterized by recurring chromosomal abnormalities and point mutations [1]. Reciprocal translocations in lymphoid malignancies lead to either creation of chimeric genes or dysregulation of a proto-oncogene when juxtaposed with the *IGHα* locus [1].

We report two cases with a B-cell precursor ALL (BCP-ALL) in which the recombination of the *IGHα* gene at 14q32.3 with two new partner loci, on 2q14.3 and 17q21, respectively, was demonstrated by fluorescence in situ hybridization (FISH).

The first case, a 16-year-old boy was diagnosed in September 2005 at another institution as having a B-cell acute lymphoblastic leukemia based on a cellular infiltrate of undifferentiated cells in the bone marrow biopsy. Immunohistochemistry showed positivity of blast cells for CD34, CD45, CD10, and TdT, whereas they were negative for CD1a, CD3, CD20, CD117, and CD68. The bone marrow aspirate yielded little material and no additional studies were performed. The patient started induction therapy according to the ALL PETHEMA protocol, which includes vincristine, daunorubicin, asparaginase, and prednisone. In November 2006, a bone marrow aspirate revealed 50% blast cells. Immunophenotyping of the blast cells was: CD34, HLA-DR, cytoplasmic CD79a, CD10, CD19, CD20, and CD13 positive, and CD2, cytoplasmic CD3, CD7, CD33 and cytoplasmic mu chains negative.

Cytogenetic study on unstimulated bone marrow cells showed a 47,XY,t(2;14)(q14.3;q32),add(12)(q23),+mar[6]/46,XY[15] karyotype. FISH analysis using a commercial dual-color break-apart probe for *IGHα* [5' *IGHα* (Spectrum Green)/3' *IGHα* (Spectrum Orange)] (Abbott Molecular, Inc./Vysis, Des Plaines, IL) displayed normal co-localization on the long arm of normal chromosome 14, whereas the 5' *IGHα* (Spectrum Green) was translocated to the der(2) and the 3' *IGHα* (Spectrum Orange) remained on the der(14) (Fig. 1A), confirming the involvement of the *IGHα* gene. The patient underwent an allogeneic bone marrow transplant and was in complete remission at the last follow-up in December 2007.

The second case, a 15-year-old boy was admitted to our hospital in May 2004 for fever and bone pain. Physical

examination disclosed cutaneous pallor and hepatosplenomegaly, but there was no lymphadenopathy. The white blood cell count was $7 \times 10^9/L$, with 69% blast cells, hemoglobin level 96 g/L, and platelet count $17 \times 10^9/L$. A biochemistry profile showed LDH 1488 U/L (normal range 230–460 U/L).

The bone marrow aspirate showed massive infiltration by atypical lymphoblasts. Immunophenotyping of the blast cells was: HLA-DR, CD10, CD13, CD19, CD20, cytoplasmic CD79a, and TdT positive, and CD33, CD34, CD7, CD2, cytoplasmic CD3, cytoplasmic mu chains negative.

A cytogenetic study of unstimulated bone marrow cells revealed a 47,XY,+10,t(14;17)(q32;q21)[15] karyotype. FISH analysis using a commercial dual-color break-apart probe for *IGHα* [5' *IGHα* (Spectrum Green)/3' *IGHα* (Spectrum Orange)] (Abbott Molecular, Inc./Vysis) displayed normal colocalization on the long arm of normal chromosome 14, whereas the 5' *IGHα* (Spectrum Green) was translocated to the der(17) and the 3' *IGHα* (Spectrum Orange) remained on the der(14) (Fig. 1C), confirming the involvement of the *IGHα* gene. The patient underwent an ALL-99 SHOP protocol, which includes daunorubicin, vincristine, prednisolone, cyclophosphamide, asparaginase and methotrexate. He achieved complete remission and was free of disease at last follow-up in December 2007.

Chromosomal translocations, namely t(8;14)(q24;q32), t(14;18)(q32;q21), t(11;14)(q13;q32) and t(3;14)(q27;q32) are the classical examples of rearrangement of the immunoglobulin gene in mature B-cell malignancies. The expression of *MYC*, *BCL2*, *CCND1*, and *BCL6* genes, respectively, is dysregulated as a consequence of these translocations [2].

In BCP-ALL, several other proto-oncogenes have also been reported to be rearranged with the *IGHα* locus by chromosomal translocations such as t(1;14)(q21;q32)/*IGHα-BCL9*, t(1;14)(q25;q32)/*IGHα-LIM*, t(6;14)(p22;q32)/*IGHα-Id4*, t(14;19)(q32;q13)/*IGHα-CEBPA* or *IGHα-CEBPG*, t(8;14)(q11;q32)/*IGHα-CEBPD*, inv(14)(q11q32)/t(14;14)(q11;q32)/*IGHα-CEBPE* and t(14;20)(q32;q13)/*IGHα-CEBPB* [3–7].

We identified two new partner loci, on 2q14.3 and 17q21. Both are involved in reciprocal translocations with the *IGHα* gene and were previously unrecognized in BCP-ALL. Both patients were adolescents. White blood

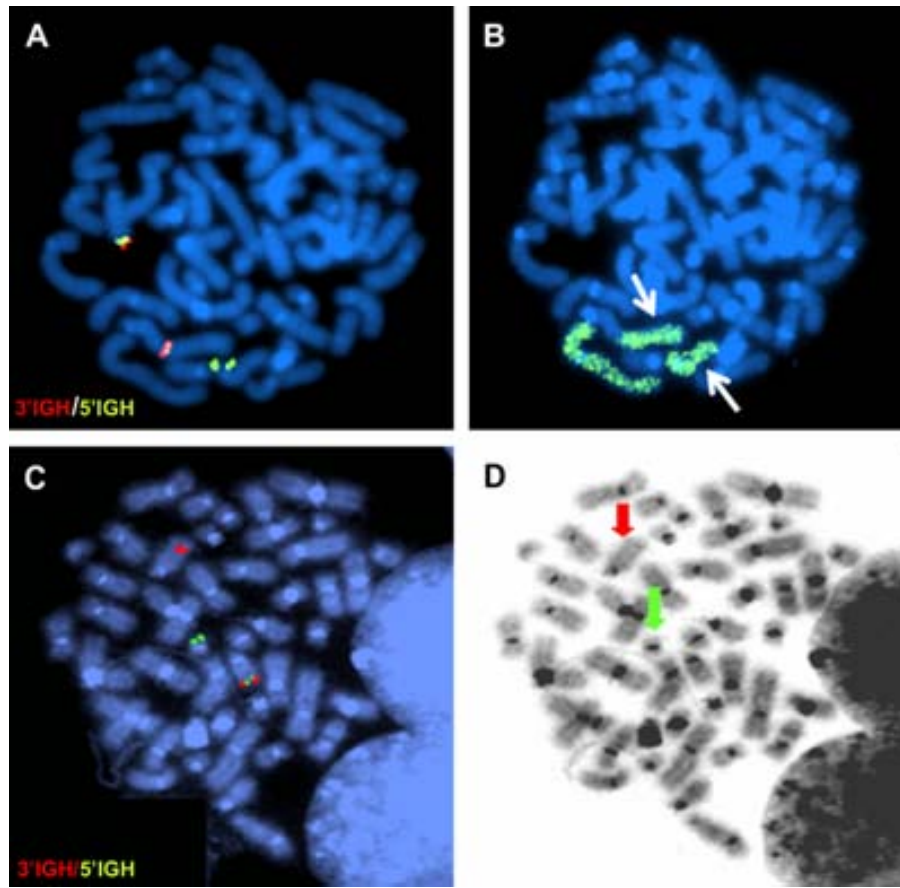


Fig. 1. (A,C) FISH on metaphase spreads using the LSI dual-color *IGH* α break-apart probe, displaying the 5' *IGH* α probe (SpectrumGreen) translocated to the derivative chromosomes 2 (case 1) and 17 (case 2). The *IGH* α 3' flanking probe (SpectrumOrange) remained on the derivative chromosome 14 in both cases. (B) Case 1: FISH on metaphase spreads using a whole chromosome paint for chromosome 2 showing three hybridization signals on the normal chromosome 2 (arrowhead), and on the derivative chromosomes 14 and 2 (arrow). (D) Case 2: Destained G-banded metaphase showing the derivative chromosomes 14 (red arrow) and 17 (green arrow).

cell count was $<20 \times 10^9/l$, there was no central nervous system involvement, and blast cells had a precursor B immunophenotype with expression of myeloid CD13 antigen. Cytogenetically, both patients showed other chromosomal aberrations in all abnormal metaphases. The rearrangement involving the *IGH* α locus at 14q32.3 is usually the primary chromosomal abnormality in B-cell malignancies. t(2;14)(q14.3;q32) and t(14;17)(q32;q21) may thus represent the pathogenetically essential aberration in BCP-ALL. Despite the limited follow-up, our patients may belong to the subgroup of BCP-ALL with *IGH* α /14q32 translocations associated with a good prognosis as pointed out by Robinson et al. [8].

Further molecular characterization of these novel breakpoints will identify potential proto-oncogenes of pathogenetic importance in B-cell malignancies.

Acknowledgments

C.M. is partially supported by AIRC (Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro) and by MIUR (Ministero dell'Istruzione, dell'Università, e della Ricerca Scientifica).

Anna Aventín
Jana Sánchez
Josep F. Nomdedéu
*Department of Hematology, Hospital Sant Pau
Autonomous University of Barcelona
Avda. Sant Antoni M^a Claret, 167, 08025 Spain*

Cristina Estany
Pilar Forcada
*Department of Hematology and Pathology
Hospital Mutua de Terrassa, Barcelona, Spain*

Roberta La Starza
Cristina Mecucci
*Hematology and Bone Marrow Transplantation Unit
University of Perugia, Perugia, Italy*

References

- [1] Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;334:1535–48.

- [2] Willis TG, Dyer MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 2000;96:808–22.
- [3] Willis TG, Zalcborg IR, Coignet LJA, Wlodarska I, Stul M, Jadayel DM, Bastard C, Treleaven JG, Catovsky D, Silva MLM, Dyer MJS. Molecular cloning of translocation t(1;14)(q21;q32) defines a novel gene (BCL9) at chromosome 1q21. *Blood* 1998;91:1873–81.
- [4] Kawamata N, Sakura S, Sugimoto K, Isobe Y, Kobayashi H, Oshimi K. A novel chromosomal translocation t(1;14)(q25;q32) in pre-B acute lymphoblastic leukemia involves the LIM homeodomain protein gene, Lhx4. *Oncogene* 2002;21:4983–91.
- [5] Bellido M, Aventín A, Lasa A, Estivill C, Carnicer MJ, Pons C, Matías Guiu X, Bordes R, Sierra J, Nomdedéu JF. Id4 is deregulated by a t(6;14)(p22;q32) chromosomal translocation in a B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003;88:994–1001.
- [6] Chapiro E, Russell L, Radford-Weiss I, Bastard C, Lessard M, Struski S, Cave H, Fert-Ferrer S, Barin C, Maarek O, Della-Valle V, Strefford JC, Berger R, Harrison CJ, Bernard OA, Nguyen-Khac F. Overexpression of CEBPA resulting from t(14;19)(q32;q13) of human precursor B acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006;108:3560–3.
- [7] Akasaka T, Balasa T, Russell LJ, Sugimoto K, Majid A, Walewska R, Karran EL, Brown DG, Cain K, Harder L, Gesk S, Martin-Subero JI, Atherton MG, Brüggemann Calasanz MJ, Davies T, Haas OA, Hagemeijer A, Kempski H, Lessard M, Lillington DM, Moore S, Nguyen-Khac F, Radford-Weiss I, Schoch C, Struski S, Talley P, Welham MJ, Worley H, Strefford JC, Harrison CJ, Siebert R, Dyer MJS. Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH α translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Blood* 2007;109:3451–61.
- [8] Robinson HM, Taylor KE, Jalali GR, Cheung KL, Harrison CJ, Moorman AV. T(14;19)(q32;q13): A recurrent translocation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:88–92.

3.2. LLC

3.2.1. Increment en la detecció d'alteracions cromosòmiques amb I-FISH en cultius estimulats amb TPA (Estudi II)

L'estimulació amb TPA s'utilitza habitualment en la LLC per a la CC i la separació de CMGD per a la I-FISH. En aquest estudi es pretén valorar la utilitat de l'estimulació amb TPA per a l'anàlisi de la I-FISH.

- Detecció d'alteracions:

S'ha realitzat la I-FISH en 49 pacients mitjançant CMGD (I-FISH-CMGD) i cultius estimulats amb TPA (I-FISH-TPA), amb les sondes comercials de significat pronòstic que identifiquen les delecions 11q23, 13q14, 17p13 i trisomia 12 i s'ha comparat el nombre de nuclis patològics obtinguts en ambdues metodologies (**figura 21, pàgina 87**). En 7 pacients es van realitzar dues determinacions utilitzant dues sondes (*table 1* de la publicació). La proporció de nuclis patològics observats per I-FISH-TPA va ser significativament superior que la observada en I-FISH-CMGD ($P < 0.001$). La detecció de les anomalies cromosòmiques es va incrementar del 51% observat per I-FISH-CMGD fins el 78% observat per I-FISH-TPA. Entre les 56 determinacions, 15 eren normals per I-FISH-CMGD o amb un percentatge de nuclis proper al valor de positivitat (**taula 17, pàgina 96**) van ser patològics per I-FISH-TPA per a les delecions 11q- (n=2), 13q- (n=9) i trisomia 12 (n=4). Les alteracions d'aquests casos van ser confirmats per CC i/o met-FISH, excepte un amb delecio 13q.

- Recompte de limfòcits:

És de destacar que el recompte de limfòcits absolut dels 15 casos presentaven una lleugera limfocitosi. Aquesta dada va suggerir que el recompte de limfòcits seria un indicador per realitzar la I-FISH-TPA, observant-se que un recompte de limfòcits absolut $< 8,7 \times 10^9/L$ és un valor crític ($P = 0.037$) i per valors inferiors es recomana la I-FISH-TPA en lloc de la I-FISH-CMGD.

Aquest estudi posa de manifest que la I-FISH-TPA no només identifica una proporció de nuclis aberrants més elevada si no que també, detecta casos patològics que poden quedar emmascarats utilitzant la I-FISH-CMGD, especialment aquells casos que presenten un recompte de limfòcits absolut baix.

Short communication

Detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia increased by interphase fluorescence in situ hybridization in tetradecanoylphorbol acetate–stimulated peripheral blood cells

Jana Sánchez, Anna Aventín*

Department of Hematology, Hospital Sant Pau, Autonomous University of Barcelona, Avda. Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

Abstract

Interphase fluorescent in situ hybridization on unstimulated peripheral blood mononuclear cells (I-FISH-PBMC) is used to detect chromosomal abnormalities such as 11q–, 13q–, 17p–, and trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia (CLL). A total of 56 samples from 49 patients with CLL were studied using commercially available probes for chromosome regions 11q22.3 (ATM), 13q14 (13S272), 17p13 (p53) and 12 centromere (D12Z3). We compared the results obtained with I-FISH-PBMC and those with I-FISH on TPA (tetradecanoylphorbol acetate; phorbol-12-myristate-13-acetate) stimulated peripheral blood cells (I-FISH-TPA) used for conventional cytogenetics, to evaluate the usefulness of I-FISH-TPA. The proportion of abnormal nuclei obtained with the I-FISH-TPA was higher than that found with I-FISH-PBMC ($P < 0.001$). Consequently, 15 cases with a negative or borderline result with I-FISH-PBMC became positive with I-FISH-TPA for 11q– ($n = 2$), 13q– ($n = 9$), and trisomy 12 ($n = 4$). In all but one of these, chromosomal abnormalities were confirmed by either metaphase FISH or conventional G-banding. Detection of cytogenetic aberrations thus increased from 51% with I-FISH-PBMC to 78% with I-FISH-TPA. Notably, all 15 of the cases that reached the diagnostic thresholds for 11q–, 13q–, and trisomy 12 had a slight lymphocytosis. An absolute lymphocyte count $< 8.7 \times 10^9/L$ was found to be the critical threshold ($P = 0.037$) below which I-FISH-TPA rather than I-FISH-PBMC should be performed. Not only could I-FISH-TPA detect a higher proportion of abnormal interphase nuclei, but it could also identify abnormal CLL cases that might be overlooked with use of I-FISH-PBMC, especially those with low absolute lymphocyte counts. I-FISH-TPA is thus a reliable technique for clinical diagnostics in CLL. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The chromosomal abnormalities 11q–, 13q–, 17p–, and trisomy 12 have prognostic significance for patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) [1,2]. Several studies have shown that the interphase fluorescent in situ hybridization technique (I-FISH) in CLL identifies such genomic aberrations in a higher frequency than does classical karyotyping, including stimulated cultures using standard B-cell-specific mitogens [3–6].

For routine clinical cytogenetic evaluation of CLL, we use a tetradecanoylphorbol acetate (phorbol-12-myristate-13-acetate; TPA) stimulated whole peripheral blood culture for conventional cytogenetics and unstimulated peripheral

blood mononuclear cells (PBMC) separated by a standard density gradient for I-FISH. Our objective was to compare I-FISH-TPA and I-FISH-PBMC for detecting the above-mentioned chromosomal abnormalities in CLL, in order to test whether TPA-stimulated peripheral blood might be a convenient sample not only for conventional cytogenetics but also for interphase analysis.

2. Materials and methods

2.1. Patients

The study sample comprised 49 patients with CLL, as diagnosed by morphology and immunological markers. Diagnostic samples were studied in 23 patients. A total of 56 samples were compared for del(11q) ($n = 10$), del(13q) ($n = 25$), del(17p) ($n = 12$), and trisomy 12 ($n = 9$).

* Corresponding author. Tel.: +34-93-2919000 ext. 2356.

E-mail address: aaventin@santpau.es (A. Aventín).

2.2. Conventional cytogenetics and cell isolation

TPA (50 ng/mL) stimulated whole peripheral blood sample (TPA-SPB) was cultured in RPMI medium supplemented with fetal calf serum for 72 or 96 hours. Cells were harvested using routine cytogenetic techniques. Chromosomes were identified by G-banding. PBMCs were isolated using density-gradient centrifugation (Histopaque; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), treated with KCl, and fixed according to standard cytogenetic methods.

2.3. Fluorescent in situ hybridization

I-FISH was performed on TPA-SPB and PBMC using locus-specific probes 11q22.3 (ATM), 13q14 (13S272), 17p13.1 (p53), telomeric 13q (D13S1160), and centromeric 12 (D12Z3) according to the manufacturer's instructions (Qbiogene, Carlsbad, CA); the telomeric 13q probe was used as an internal control for hemizygous deletion (13q-). For each probe, 200 nuclei were scored. Based on FISH studies of normal peripheral blood cells, the upper limits of normal (mean + 3 standard deviations) were set at 6, 7, 5, and 2% for del(11q), del(13q), del(17p), and trisomy 12, respectively. Samples were considered borderline

cases if abnormal nuclei were at 6–10%, 7–10%, 5–10%, and 2–5% for del(11q), del(13q), del(17p), and trisomy 12, respectively. Interphase FISH analyses were undertaken by a single observer. In metaphase FISH, a clone was considered abnormal clone when at least two metaphases had an abnormal signal pattern.

2.4. Statistical analysis

The data were analyzed using the nonparametric Wilcoxon test and unpaired Student *t*-test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using the SPSS package (version 14.0; SPSS, Chicago, IL).

3. Results and discussion

Clinicopathologic and genetic data for the 49 patients are summarized in Table 1. A total of 56 specimens were compared using I-FISH-TPA and I-FISH-PBMC techniques. The median of abnormal nuclei was 39 with the I-FISH-TPA and 10 with the I-FISH-PBMC ($P < 0.001$, Wilcoxon test). Fifteen cases with a negative or borderline

Table 1
Clinicopathologic and genetic data of 56 samples from 49 patients with chronic lymphocytic leukemia

Case	Age/Sex	Absolute lymphocyte count ($\times 10^9/L$)	Probe	Anomaly	I-FISH, abnormal nuclei, %		Abnormal/Total metaphases	Confirmed?
					TPA	PBMC		
1	57/M	66.65	ATM	del(11q)	85	45	1/24	No ^a
2	37/M	109.07	ATM	del(11q)	44	19	2/25	Yes ^a
3	59/M	43.94	ATM	del(11q)	87	36	3/15	Yes ^a
4	42/M	8.83	ATM	del(11q)	56 ^b	1 ^b	16/34	Yes ^a
5	68/M	87.73	ATM	del(11q)	23	30	13/18	Yes ^c
6	79/M	21.25	ATM	del(11q)	15	13	3/20	Yes ^a
7	62/M	15.55	ATM	del(11q)	4 ^d	8 ^d	0/25	No ^a
8	55/F	16.90	ATM	del(11q)	61	16	3/20	Yes ^a
9	73/M	7.63	13S272	del(13q)	77 ^b	4 ^b	8/12	Yes ^a
10	59/M	77.38	13S272	del(13q)	73	70	10/15	Yes ^a
11	75/M	6.21	13S272	del(13q)	38 ^b	10 ^b	3/25	Yes ^a
12	64/F	7.56	13S272	del(13q)	7 ^d	3 ^d	0/15	No ^a
13	49/M	23.56	13S272	del(13q)	20 ^b	10 ^b	4/25	Yes ^a
14	53/F	27.12	13S272	del(13q)	57 ^c	40 ^c	1/25	No ^a
15	51/F	62.17	13S272	del(13q)	76 ^c	54 ^c	NM	—
16	61/M	91.04	13S272	del(13q)	90 ^c	69 ^c	NM	—
17	87/F	16.43	13S272	del(13q)	78	34	18/20	Yes ^a
18	45/M	33.30	13S272	del(13q)	14	12	NM	—
19	80/F	17.59	13S272	del(13q)	1 ^d	4 ^d	0/25	No ^a
20	60/M	9.34	13S272	del(13q)	23 ^{b,c}	10 ^{b,c}	4/15	Yes ^a
21	63/F	16.24	13S272	del(13q)	12 ^b	8 ^b	1/55	No ^a
22	74/M	13.20	13S272	del(13q)	69	20	3/45	Yes ^a
23	55/M	9.94	13S272	del(13q)	51 ^b	10 ^b	4/20	Yes ^a
24	67/M	6.02	13S272	del(13q)	68 ^b	5 ^b	4/23	Yes ^a
25	82/M	3.66	13S272	del(13q)	59 ^b	10 ^b	3/14	Yes ^a
26	76/F	8.67	13S272	del(13q)	47	12	8/20	Yes ^a
27	49/M	181.13	p53	del(17p)	22	66	3/25	Yes ^a
28	65/M	24.54	p53	del(17p)	3 ^d	5 ^d	0/15	No ^a

(Continued)

Table 1
Continued

Case	Age/Sex	Absolute lymphocyte count ($\times 10^9/L$)	Probe	Anomaly	I-FISH, abnormal nuclei, %			Confirmed?
					TPA	PBMC	Abnormal/Total metaphases	
29	51/M	64.94	p53	del(17p)	23	44	NM	—
30	62/M	13.83	p53	del(17p)	3^d	6^d	0/20	No ^a
31	68/M	399.06	p53	del(17p)	85	47	NM	—
32	76/M	25.70	p53	del(17p)	1^d	0^d	0/18	No ^c
33	66/M	137.89	p53	del(17p)	63	52	18/20	Yes ^c
34	61/M	60.23	p53	del(17p)	17	14	NM	—
35	64/F	27.96	D12Z3	+12	43	46	2/35	Yes ^c
36	53/M	5.36	D12Z3	+12	30^b	2^b	6/20	Yes ^c
37	76/F	24.03	D12Z3	+12	63	36	2/35	Yes ^c
38	76/F	5.85	D12Z3	+12	47^b	0^b	13/15	Yes ^c
39	73/M	4.24	D12Z3	+12	20^b	3^b	2/20	Yes ^c
40	58/F	5.95	D12Z3	+12	22	6	5/20	Yes ^c
41	62/F	9.15	D12Z3	+12	1^d	4^d	0/21	No ^c
42	78/M	8.62	D12Z3	+12	10^b	2^b	9/20	Yes ^c
43	69/M	14.54	13S272	del(13q)	48	22	9/20	Yes ^a
			p53	del(17p)	0^d	8^d	0/20	No ^a
44	84/F	8.11	13S272	del(13q)	17^b	4^b	5/40	Yes ^a
			p53	del(17p)	4^d	6^d	0/15	No ^a
45	70/F	7.08	ATM	del(11q)	57^b	8^b	9/15	Yes ^a
			13S272	del(13q)	48	11	11/18	Yes ^a
46	59/F	102.95	13S272	del(13q)	95	64	NM	—
			p53	del(17p)	87	84	NM	—
47	65/M	18.97	13S272	del(13q)	45	12	3/20	Yes ^a
			p53	del(17p)	3^d	6^d	0/18	No ^a
48	58/F	8.75	ATM	del(11q)	3^d	5^d	0/20	No ^a
			13S272	del(13q)	40	15	2/20	Yes ^a
49	80/F	4.01	13S272	del(13q)	1^d	1^d	0/15	No ^a
			D12Z3	+12	28	14	0/25	No ^a
Median					39	10		
Mean \pm SD					38 \pm 29	20 \pm 21		

Abbreviations: F, female; FISH, fluorescence in situ hybridization; I-FISH, interphase FISH; M, male; NM, no mitosis; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; SD, standard deviation; TPA, tetradecanoylphorbol acetate (phorbol myristate acetate).

^a Metaphase FISH used for confirmation testing.

^b Bold italic type highlights samples that became positive with I-FISH-TPA.

^c G-banding used for confirmation testing.

^d Bold type highlights negative or borderline result with I-FISH-PBMC.

^e Biallelic deletion.

result with I-FISH-PBMC became positive with I-FISH-TPA for del(11q) (nos. 4 and 45), del(13q) (nos. 9, 11, 13, 20, 21, 23, 24, 25, and 44), and trisomy 12 (nos. 36, 38, 39, and 42). In all but one of these (no. 21), chromosomal abnormalities were confirmed by either metaphase FISH or G-banding karyotyping. Some cases (e.g., nos. 4 and 45) showed a high number of abnormal ATM/del(11q) metaphases, which probably would have been missed if we had used only conventional cytogenetics instead of metaphase FISH. These findings are in line with those recently published by Stockero et al. [7], who reported evidence that CLL metaphases with normal G-bands have cryptic interstitial deletions in 13q14 detectable by metaphase FISH. On the other hand, cases in which chromosomal aberrations were identified in only a few metaphases would be due either to the predominance of residual normal lymphocytes or to the difficulty in obtaining dividing neoplastic B cells.

It is well documented that I-FISH is superior to conventional cytogenetics, even conventional cytogenetics using standard B-cell-specific mitogens to identify prognostically relevant genomic aberrations in CLL [2–6]. The literature is lacking, however, for comparison of I-FISH on noncultured and cultured cells in CLL. In the present study, I-FISH-TPA increased the percentages of aberrant interphase nuclei, compared with I-FISH-PBMC, and the detection of chromosomal abnormalities was 78% versus 51%, respectively. It is noteworthy that all 15 of the cases that reached the diagnostic thresholds for del(11q), del(13q), and trisomy 12 had a slight lymphocytosis. Using the unpaired *t*-test, an absolute lymphocyte count $< 8.7 \times 10^9/L$ was found to be the critical threshold ($P = 0.037$) below which I-FISH-TPA should be performed rather than I-FISH-PBMC. To validate the definitive critical threshold, however, more cases need to be analyzed.

Precise quantification of abnormal interphase nuclei can be clinically important, as suggested recently by Catovsky et al. [8], who observed that the percentage of abnormal del(17p) cells correlated with the percentage of nonresponders analyzed in the British CLL-4 LRF trial. In this regard, our observation may be of particular interest for future comparative clinical CLL studies, given that, in cases 27 and 29 with p53 deletion, the clone size detected with TPA culture was smaller than that detected with PBMC. It is important, therefore, to be aware of the method used in quantitative cytogenetic studies. Although it is beyond the scope of the present study to provide an explanation for our observation, it has already been observed in chronic myeloid leukemia that short-term culturing influences the number of *BCR-ABL* positive interphase nuclei detected by FISH [9,10].

In conclusion, we have shown that I-FISH-TPA not only can detect a higher proportion of abnormal interphase nuclei but can also identify abnormal CLL cases that may be overlooked by using I-FISH-PBMC. I-FISH-TPA is a reliable technique for clinical diagnostics in CLL and for cases with low absolute lymphocyte counts it should be the technique of choice.

References

- [1] Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Cuneo A, Knuutila S, Elonen E, Gahrton G. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990;323:720–4.
- [2] Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910–6.
- [3] Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med* 1999;77:266–81.
- [4] Chena C, Arrossagaray G, Scolnik M, Palacios MF, Slavustky I. Interphase cytogenetic analysis in Argentinean B-cell chronic lymphocytic leukemia patients: association of trisomy 12 and del (13q14). *Cancer Genet Cytogenet* 2003;154–60.
- [5] Aoun P, Blair HE, Smith LM, Dave BJ, Lynch J, Weisenburger DD, Pavletic SZ, Sanger WG. Fluorescent in situ hybridization detection of cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2004;45:1595–603.
- [6] Wiktor A, Van Dyke DL. Combined cytogenetic testing and fluorescent in situ hybridization analysis in the study of chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;153:73–6.
- [7] Stockero KJ, Fink SR, Smoley SA, Paternoster SF, Shanafelt TD, Call TG, Zent CS, Van Dyke DL, Kay NE, Dewald GW. Metaphase cells with normal G-bands have cryptic interstitial deletions in 13q14 detectable by fluorescence in situ hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;166:152–6.
- [8] Catovsky D, Richards S, Matutes E, Burford A, Brito-Babapulle V, Dearden C, Morris P, Pettitt A. Response to therapy and survival in CLL is influenced by genetic markers: preliminary analysis from the LRF CLL4 trial [Abstract]. *Blood* 2004;104:8a.
- [9] Wilkens L, Varga S, Werner M, Nolte M, v Wasielewski R, Georgii A. Short-term culturing influences the number of bcr/abl-fused cells detected by fluorescence in situ hybridisation in bone marrow aspirates of CML patients. *Pathobiology* 1999;67:163–8.
- [10] Schoch C, Schnittger S, Bursch S, Gerstner D, Hochhaus A, Berger U, Hehlmann R, Hiddemann W, Haferlach T. Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia* 2002;16:53–9.

3.2.2. Increment del valor pronòstic de la I-FISH en cultius estimulats amb TPA respecte a la I-FISH en CMGD (Estudi III)

L'objectiu ha estat avaluar la importància clínica de la utilització de la I-FISH-TPA en 235 pacients de LLC seguint la metodologia de l'estudi II (**figura 22, pàgina 87**). S'ha realitzat la I-FISH en 3 grups de pacients: en el primer només s'ha realitzat en CMGD, en el segon s'ha realitzat en CMGD i en cultius estimulats amb TPA, i en el tercer només en cultius estimulats amb TPA, i s'han comparat els resultats de la I-FISH obtinguts en els tres grups.

En el segon grup, la detecció d'alteracions cromosòmiques ha estat superior mitjançant I-FISH-TPA (80%) que mitjançant I-FISH-CMGD (57%) de forma significativa ($P = 0.014$). En 13 pacients amb resultats normals de I-FISH-CMGD van presentar alteracions mitjançant la I-FISH-TPA. Les corbes de Kaplan-Meier van mostrar que la I-FISH-TPA prediu millor la SLT entre les alteracions de bó/intermig-mal pronòstic al comparar-se amb la I-FISH-CMGD ($P = 0.031$ vs. 0.166), considerant de bon pronòstic la deleció 13q com única alteració o l'absència d'anomalies, i d'intermig-mal pronòstic la trisomia 12 i delecions 11q i 17p. La I-FISH-TPA també millora la predicció de la SG ($P = 0.007$ vs. 0.017).

En la comparació històrica entre el primer i tercer grup de pacients, la I-FISH-CMGD detecta el 46% de casos patològics i la I-FISH-TPA el 67% ($P = 0.006$). La detecció de les diferents anomalies és equivalent, exceptuant la deleció 13q14 com a única alteració que s'observa en les CMGD en el 10% dels casos i en els cultius amb TPA en el 37% ($P = 0.006$). En quant a la SLT, en el grup que només s'ha fet I-FISH-CMGD, els pacients amb deleció 13q tenen una SLT més curta que els normals (18 vs. 107 mesos), i en el grup que només s'ha fet I-FISH-TPA, els pacients amb o sense deleció tenen una SLT similar. Cal destacar que en algun d'aquests casos la limfocitosi és baixa. La I-FISH-TPA incrementa la detecció de la deleció 13q i millora el valor pronòstic.

The Use of Tetradecanoylphorbol Acetate-Stimulated Peripheral Blood Cells Enhances the Prognostic Value of Interphase Fluorescence In Situ Hybridization in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia

Julio Delgado,^{1*} Anna Aventin,¹ Javier Briones,¹ Jana Sanchez,¹ Josep Nomdedeu,¹ and Jorge Sierra^{1,2}

¹Department of Haematology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

²Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Interphase fluorescence in situ hybridization (I-FISH) studies have a remarkable prognostic value in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). I-FISH studies can be performed either on tetradecanoylphorbol acetate stimulated peripheral blood cells (I-FISH-TPA) or unstimulated peripheral blood mononuclear cells (I-FISH-PBMC). The aim of the study was to evaluate whether this finding was clinically relevant in a group of 235 patients with CLL. Fifty-six patients had both I-FISH-TPA and I-FISH-PBMC results. Compared with uncultured cells, the cytogenetic detection rate rose from 57 to 80% with the use of TPA-stimulated cells ($P = 0.014$). I-FISH-TPA provided a better prediction of treatment-free survival compared with I-FISH-PBMC ($P = 0.031$ vs. 0.166). Then, I-FISH-PBMC results from 93 historical patients were compared with 86 recent patients with I-FISH-TPA results. Genomic aberrations were detected in 46 and 67% of patients from the I-FISH-PBMC and I-FISH-TPA cohorts, respectively. The detection rate of 13q deletion as the only aberration increased from 10% with I-FISH-PBMC to 37% with I-FISH-TPA ($P = 0.006$). In conclusion, I-FISH-TPA increased the detection rate of 13q deletion and had an improved prognostic value compared with I-FISH-PBMC. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a hematologic malignancy characterized by a variable clinical course (Chiorazzi et al., 2008). Multiple studies performed in the last decade have been able to identify new powerful prognostic markers for these patients, most of which are currently available in clinical practice (Moreno and Montserrat, 2008). In particular, specific chromosomal aberrations have a remarkable prognostic impact on patients with CLL. Unfortunately, conventional chromosome banding analysis (CBA) is effective in 40–50% of cases as only dividing cells are evaluable by CBA and CLL cells are notoriously difficult to stimulate to divide (Juliussen et al., 1990). Recent studies using novel B-cell mitogens, such as the CpG-oligonucleotide DSP30 and interleukin-2, have greatly improved the value of CBA for CLL, but the use of these new molecules should still be considered experimental (Haferlach et al., 2007).

Interphase fluorescence in situ hybridization (I-FISH) was developed in an attempt to circumvent this deficiency. I-FISH does not require cell division and is able to identify genomic aberrations in a higher proportion of patients with CLL compared with CBA. When a comprehensive set

of probes is used, the percentage of patients with CLL with genomic abnormalities reaches 80% (Döhner et al., 2000), while a commercial four-probe panel identifies genetic aberrations in ~60–70% of cases (Glassman and Hayes, 2005; Reddy, 2006; Nelson et al., 2007). These aberrations have a reproducible prognostic power in terms of response to therapy (Catovsky et al., 2007), treatment-free survival (TFS) and overall survival (OS) of patients with CLL (Döhner et al., 2000). Indeed, the recently published National Cancer Institute guidelines recommend the incorporation of I-FISH to the diagnostic work-up of all patients with CLL (Hallek et al., 2008). In current practice, five prognostic categories are defined within a hierarchical model: 17p deletion, 11q deletion, trisomy 12, normal karyotype, and 13 deletion as the sole abnormality. Patients with 17p deletions have the shortest median TFS (9 months) and those with 13q

*Correspondence to: Julio Delgado, Servei d'Hematologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret 167, 08025, Barcelona, Spain. E-mail: jdelgadog@santpau.cat

Received 6 July 2009; Accepted 23 November 2009

DOI 10.1002/gcc.20744

Published online 23 December 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

TABLE 1. Patients' Baseline Characteristics

	I-FISH-PBMC cohort (n = 93)	I-FISH-TPA cohort (n = 86)	Double I-FISH analysis (n = 56)	P value (Kruskal-Wallis or Chi-square tests)
Age at diagnosis (years), median (range)	64 (42–84)	66 (29–88)	63 (39–87)	0.398
Sex, male/female (%)	60/33 (65/35)	39/47 (45/55)	37/19 (66/34)	0.008
Binet stage C at diagnosis, n (%)	6 (6)	4 (5)	2 (4)	0.717
Lymphocyte count $\times 10^9/L$, median (range)	13 (5–203)	15 (5–278)	20 (5–399)	0.046
Positive CD38 expression, n (%)	20 (33)	15 (19)	10 (27)	0.172
Positive ZAP-70 expression, n (%)	29 (50)	32 (46)	14 (42)	0.770
Unmutated IGHV gene, n (%)	31 (56)	18 (44)	20 (56)	0.433
Beta ₂ microglobulin, median (range)	2.2 (1.1–7.0)	2.5 (1.0–17.4)	2.2 (1.1–7.8)	0.139
Patients requiring any therapy, n (%)	54 (57)	26 (29)	34 (61)	<0.001
Chlorambucil, n (% of patients treated)	31 (59)	9 (33)	21 (62)	0.053
COP/CHOP, n (% of patients treated)	20 (38)	4 (14)	11 (32)	0.107
Prednisone, n (% of patients treated)	6 (11)	3 (11)	7 (21)	0.422
Fludarabine, n (% of patients treated)	36 (68)	15 (56)	18 (53)	0.315
Rituximab, n (% of patients treated)	11 (21)	9 (33)	7 (21)	0.402
Alemtuzumab, n (% of patients treated)	7 (13)	3 (11)	6 (18)	0.745
Follow-up (months), median (range)	65 (6–247)	23 (0–268)	69 (0–247)	<0.001

IGHV, immunoglobulin heavy chain variable region; COP, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone; CHOP, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; I-FISH, interphase fluorescence in situ hybridization; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; TPA, tetradecanoylphorbol acetate; n, number.

deletions had the longest (92 months) (Döhner et al., 2000).

Taking into account that I-FISH does not require cell division, routine I-FISH studies are generally performed on uncultured peripheral blood mononuclear cells (I-FISH-PBMC) (Matutes et al., 1999). However, I-FISH can also be applied to cultured peripheral blood cells previously stimulated with tetradecanoylphorbol acetate (I-FISH-TPA) or other mitogens. We have previously observed that I-FISH-TPA is able to detect genomic abnormalities, particularly 13q deletion, that might be overlooked with I-FISH-PBMC (Sanchez and Aventin, 2007). The aim of the study was to address whether this increased detection of 13q deletion had a significant impact on the TFS of a group of consecutive patients with CLL.

MATERIALS AND METHODS

Patient Selection

Our institutional database was screened for cases with information available on the following variables: Morphological and immunological diagnosis of CLL according to the WHO classification, age at diagnosis, gender, Binet clinical stage, genomic abnormalities as detected by I-FISH, time and type of CLL-specific treatment, and overall survival. Analyses of the immunoglobulin gene mutation status, CD38 expression and ZAP-

70 expression were performed using conventional methods (Muñoz et al., 2007) and were available in a proportion of patients.

Standard clinical criteria were used for defining the initiation of therapy in all patients (Cheson et al., 1996). First line treatment varied from patient to patient, but was mostly based on alkylating agents and/or purine analogues (Table 1).

FISH Analysis

For the purpose of this analysis, patients were divided into three groups: 93 patients diagnosed from June 2000 to June 2006 who had their I-FISH analysis performed on unstimulated peripheral blood mononuclear cells only (I-FISH-PBMC); 86 patients diagnosed from March 2005 to October 2008 who had their I-FISH tests performed on whole blood TPA-stimulated cells only (I-FISH-TPA); and 56 patients diagnosed from January 2002 to June 2006 who had their I-FISH analysis performed on both TPA-stimulated and unstimulated PBMC. In this last group of patients, both tests were performed on the same blood sample.

All I-FISH studies were performed in peripheral blood samples as previously described (Sanchez and Aventin, 2007). All patients had significant lymphocytosis (i.e., $>5 \times 10^9/L$) at the time of analysis and, of those who received treatment for their CLL, I-FISH tests were performed before therapy in 69% of them. For I-FISH-PBMC tests, PBMC

TABLE 2. I-FISH Results from 56 Patients Who Had Their Tests Performed both on Peripheral Blood Uncultured Cells and TPA-Stimulated Cells (Head-to-Head Comparison)

	I-FISH-PBMC		I-FISH-TPA		P value (Fisher's exact test) ^a	Döhner et al. (2000)	
	n (%)	Median TFS (months)	n (%)	Median TFS (months)		n (%)	Median TFS (months)
No abnormalities	24 (43)	54	11 (20)	84	0.014	57 (18)	92
13q deletion (monoallelic)	13 (23)	57	20 (36)	140	0.213	117 (36)	49
13q deletion (biallelic)	3 (5)	Not reached	4 (7)	59	1.0		
Trisomy 12	4 (7)	67	7 (12)	60	0.527	47 (14)	33
11q deletion	6 (11)	29	8 (14)	27	0.776	56 (17)	13
17p deletion	6 (11)	49	6 (11)	49	1.0	23 (7)	9

I-FISH, interphase fluorescence in situ hybridization; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; TPA, tetradecanoylphorbol acetate; n, number; TFS, treatment-free survival.

^aP values refer to comparisons between I-FISH-PBMC and I-FISH-TPA.

were isolated using density-gradient centrifugation (Histopaque, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), treated with KCl and fixed according to standard methods. For I-FISH-TPA analyses, whole blood samples were stimulated with tetradecanoylphorbol acetate (TPA, 50 ng/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), cultured in RPMI medium supplemented with fetal calf serum for 72–96 h, and harvested using routine cytogenetic methods. The following probes were used according to the manufacturer's specifications (Qbiogene, Carlsbad, CA): 11q22.3 (*ATM*), 13q14 (*I3S272*), 17p13.1 (*TP53*), and centromeric 12 (*DI2Z3*). A telomeric 13q probe (*D13S1160*) was also used as an internal control for homozygous deletion (13q-). In each test, 200 nuclei were evaluated. Based on I-FISH studies of normal PBMC, cutoff points (mean plus three standard deviations) were set at 6%, 7%, 5%, and 2% for del(11q), del(13q), del(17p), and trisomy 12, respectively. We also performed I-FISH studies on normal cells cultured with TPA, and the cutoff percentages were almost identical. Hence, the same cutoff points were used for both I-FISH-PBMC and I-FISH-TPA tests. Metaphase FISH and CBA were also performed in selected cases, but for the purposes of this report, the term "normal karyotype" refers to the absence of abnormalities by I-FISH.

I-FISH results were expressed according to Döhner's hierarchical model (Döhner et al., 2000). These cytogenetic categories are as follows: Patients with del(17p), patients with del(11q) but not del(17p), patients with trisomy 12 but not del(11q) nor del(17p), del(13q) as sole abnormality, and normal karyotype. Moreover, patients were classified into those with poor-intermediate prognosis [del(17p), del(11q), and trisomy 12] and those with good prognosis [no abnormalities detected or del(13q) only].

Statistical Analysis

The primary endpoints for comparison were TFS and OS. Kaplan–Meier curves were plotted for this purpose and the effect of the different variables assessed using the log-rank test. In the historical comparison (see later), log-rank tests were adjusted according to the FISH scorer. Baseline characteristics, prognostic factors, and FISH results were compared by using χ^2 or Fisher exact tests for discrete variables, and the Kruskal–Wallis test for continuous variables. In all statistical calculations, two-sided P values <0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed using SPSS, version 17.0.0.

RESULTS

Head-to-Head Comparison

Fifty-six patients had I-FISH results on both TPA-stimulated cells and uncultured cells. In all cases, cells were obtained from the same peripheral blood sample. Baseline characteristics of these patients are shown in Table 1. Compared with uncultured cells, the cytogenetic detection rate rose from 57% to 80% with the use of TPA-stimulated cells ($P = 0.014$) (Table 2). In total, 13 (23%) patients had their I-FISH result changed. Eight patients with no abnormalities detected on uncultured PBMC were considered to have a 13q deletion on I-FISH-TPA, which did not change their prognostic subgroup. In five additional patients with normal results by I-FISH-PBMC, we could identify the presence of trisomy 12 (three cases) and 11q deletion (two cases) by I-FISH-TPA, theoretically changing their prognosis from good to poor-intermediate. In all but one patient, either conventional

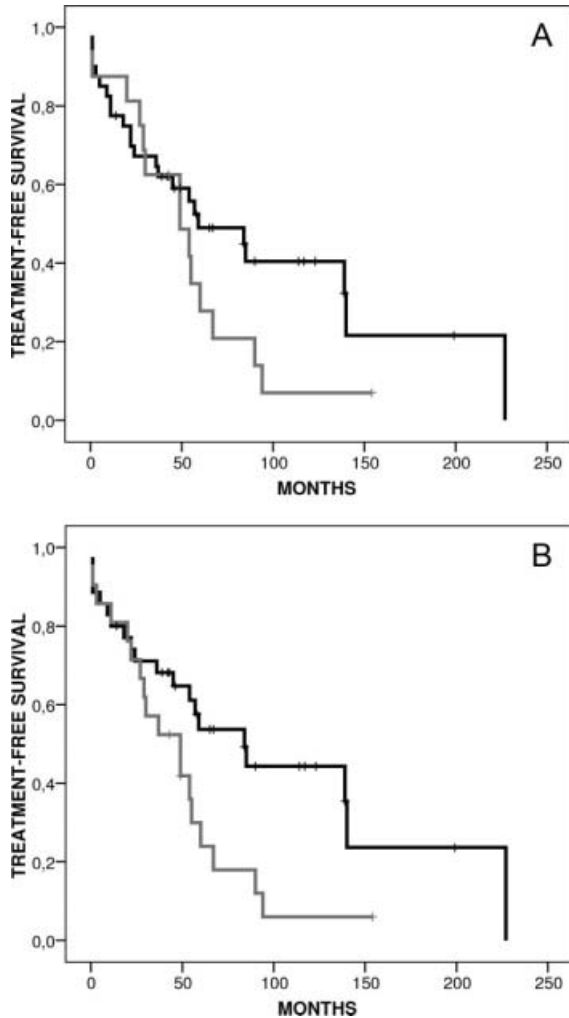


Figure 1. Treatment-free survival according to (A) I-FISH-PBMC and (B) I-FISH-TPA abnormalities in the head-to-head comparison (good prognosis = black curve; poor-intermediate prognosis = gray curve; $P = 0.166$ (A) and $P = 0.031$ (B), log-rank test). For the purpose of this analysis, 17p deletion, 11q deletion, and trisomy 12 are considered of poor-intermediate prognosis, whereas the presence of 13q deletion as the sole aberration and the absence of abnormalities are considered of good prognosis.

karyotyping or metaphase FISH confirmed these abnormalities. Interestingly, the median peripheral blood lymphocyte count in patients whose I-FISH result was changed was significantly lower than in patients in whom both tests yielded the same result (8.5 vs. $25.5 \times 10^9/L$, $P < 0.001$).

I-FISH-TPA provided a better prediction of TFS compared with I-FISH-PBMC ($P = 0.031$ vs. 0.166 , Fig. 1). In particular, two patients with no cytogenetic abnormalities detected by I-FISH-PBMC required chemotherapy 3 and 11 months after diagnosis, more in keeping with the presence of del(11q) found using I-FISH-TPA. Furthermore, of all three patients with no

abnormalities detected by I-FISH-PBMC and trisomy 12 detected by I-FISH-TPA, two received therapy 22 and 37 months after diagnosis, respectively, and one patient has not required any treatment thus far. When patients were classified into those with poor prognosis [del(17p) and del(11q)]; and those with good-intermediate prognosis [no abnormalities detected or del(13q)/trisomy 12], I-FISH-TPA also outperformed I-FISH-PBMC in terms of TFS ($P = 0.002$ vs. 0.013). Finally, I-FISH-TPA also improved the OS prediction compared with I-FISH-PBMC, with a better separation of the survival curves ($P = 0.007$ vs. 0.017).

Historical Comparison

In addition, two independent cohorts were compared, that is an I-FISH-PBMC cohort ($n = 93$) versus an I-FISH-TPA cohort ($n = 86$). Baseline characteristics of these two independent cohorts are also shown in Table 1. As predicted, patients from the I-FISH-PBMC cohort were followed up for a significantly longer period of time compared with patients from the I-FISH-TPA cohort ($P < 0.001$). As a consequence, patients requiring treatment were also more frequent in the I-FISH-PBMC cohort ($P < 0.001$), but there were no other significant differences.

Genomic aberrations were detected in 46% of patients from the I-FISH-PBMC cohort, while these were noted in 67% of patients from the I-FISH-TPA cohort ($P = 0.006$) (Table 3). When these results were analyzed in more detail, we observed that the detection rates of trisomy 12 (15% vs. 13%), 11q deletion (6% vs. 8%), and 17p deletion (15% vs. 9%) were equivalent. In contrast, the detection rate of 13q monoallelic deletion as the only aberration increased from 9 to 31% when blood cells were previously cultured and stimulated with TPA ($P < 0.001$).

Finally, the outcome of patients with no abnormalities was compared with those patients with 13q deletion as the sole aberration. In the I-FISH-PBMC cohort, patients with 13q deletion had a significantly shorter TFS than patients with no abnormalities (18 vs. 107 months, $P = 0.026$, Fig. 2A). In the I-FISH-TPA cohort, patients with and without del(13q) had similar TFS (132 months vs. not reached, $P = 0.498$, Fig. 2B). Remarkably, when patients harboring the 13q deletion as the sole abnormality were compared, those from the I-FISH-TPA cohort had a significantly lower median lymphocyte count than those

TABLE 3. I-FISH Results from Earlier Patients, Who Had Their Tests Performed on Peripheral Blood Uncultured Cells, and More Recent Patients, Who Had Their Analyses Performed on TPA-Stimulated Cells (Historical Comparison)

	I-FISH-PBMC (n = 93)		I-FISH-TPA (n = 86)		P value (Fisher's exact test) ^a	Döhner et al. (2000)	
	n (%)	Median TFS (months)	n (%)	Median TFS (months)		n (%)	Median TFS (months)
No abnormalities	50 (54)	107	28 (33)	Not reached	0.006	57 (18)	92
13q deletion (monoallelic)	8 (9)	8	27 (31)	132	<0.001	117 (36)	49
13q deletion (biallelic)	1 (1)	46	5 (6)	Not reached	0.107		
Trisomy 12	14 (15)	23	11 (13)	45	0.830	47 (14)	33
11q deletion	6 (6)	9	7 (8)	2	0.776	56 (17)	13
17p deletion	14 (15)	5	8 (9)	11	0.264	23 (7)	9

I-FISH, interphase fluorescence in situ hybridization; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; TPA, tetradecanoylphorbol acetate; n, number; TFS, treatment-free survival.

^aP values refer to comparisons between I-FISH-PBMC and I-FISH-TPA.

from the I-FISH-PBMC cohort (14.5 vs. 42.0, $P = 0.038$). Interestingly, patients with biallelic deletions did not have a statistically different TFS compared with patients with monoallelic deletions.

DISCUSSION

I-FISH has become a standard diagnostic tool in the prognostic assessment of patients with CLL, but many questions remain unsolved. I-FISH methods were devised to perform genetic evaluations in cells that are difficult to stimulate to divide, or even in paraffin-embedded lymphoid tissue. This technique is performed on interphase nuclei and, accordingly, there is no need for cell culture or mitogens prior to probe hybridization and microscope analysis. However, we have previously shown that the use of TPA-stimulated cultured cells (I-FISH-TPA) increased the detection of genomic aberrations compared with uncultured mononuclear cells (I-FISH-PBMC) (Sanchez and Aventin, 2007). The next logical step was to assess whether these different results were clinically relevant in terms of treatment-free and overall survival. To accomplish this goal, we performed a head-to-head comparison in patients who had results both on I-FISH-TPA and I-FISH-PBMC. Then, we performed a historical comparison between earlier patients who only had I-FISH-PBMC results and more recent patients who only had I-FISH-TPA analyses performed.

In the head-to-head comparison, five patients with no abnormalities by I-FISH-PBMC were

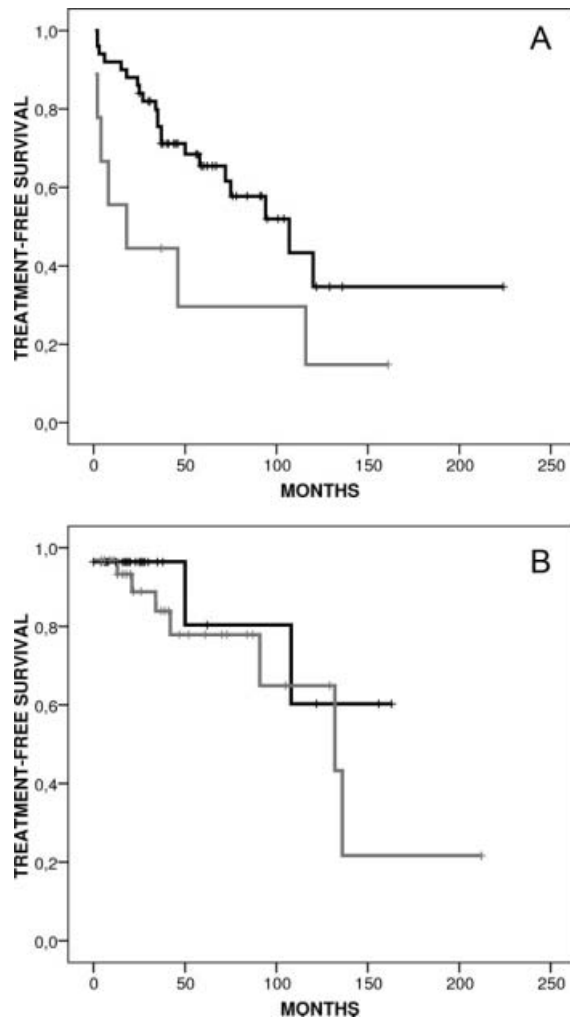


Figure 2. Treatment-free survival according to (A) I-FISH-PBMC and (B) I-FISH-TPA abnormalities in the historical comparison (normal karyotype = black curve; 13q deletion = gray curve; $P = 0.026$ (A) and $P = 0.498$ (B), log-rank test).

found to have trisomy 12 and 11q deletion by I-FISH-TPA. These changes allowed for a better prediction of TFS and OS of I-FISH-TPA compared with I-FISH-PBMC. In particular, both patients with 11q deletion had significant lymphadenopathy and required chemotherapy within 1 year of diagnosis, which are cardinal features of this cytogenetic group (Döhner et al., 1997). In nine patients, a 13q deletion revealed by I-FISH-TPA remained undetected with I-FISH-PBMC, but this did not change their prognostic classification.

In the historical comparison, the detection rate of 13q deletion as the sole abnormality was higher in the I-FISH-TPA compared with the I-FISH-PBMC cohort ($P < 0.001$). Using I-FISH-TPA, 13q deletion was observed in 37% of patients, whose median TFS was 107 months. These results are almost identical to those published by Döhner et al. (2000) in their landmark article. In contrast, only 10% of patients with CLL were found to have a 13q deletion as the only aberration by I-FISH-PBMC, and their median TFS was only 18 months.

When we looked for factors that could explain this discrepancy, we realized that in the head-to-head comparison all patients whose I-FISH result changed depending on the method used had a relatively low-lymphocyte count at the time of the analysis (median, $8.5 \times 10^9/L$; range, 5.0 – $24.0 \times 10^9/L$), meaning that I-FISH-TPA was particularly useful in these patients. Furthermore, in the historical comparison patients with a 13q deletion detected by I-FISH-TPA also had a significantly lower lymphocyte count compared with earlier I-FISH-PBMC patients. We hypothesize that a proportion of patients from the I-FISH-PBMC cohort who were considered to have a normal karyotype possibly had a 13q deletion that was overlooked because the lymphocyte count was not high enough. On the other hand, those patients from the same cohort whose 13q deletion was indeed detected had a significantly higher lymphocyte count (median, $42.0 \times 10^9/L$; range, 8.0 – $203.0 \times 10^9/L$), which could explain why their TFS was comparatively shorter.

In conclusion, I-FISH-TPA is a very reliable technique for the purpose of prognostic stratification of patients with CLL, particularly when their lymphocyte count at diagnosis is not exceedingly high. However, these results are still preliminary and a much larger prospective study directly comparing the two methods should be undertaken

before I-FISH-TPA can be recommended for routine prognostic use in CLL.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge all the physicians and the nurses who took care of these patients over the years.

REFERENCES

- 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. 2007. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): A randomized controlled trial. *Lancet* 370:230–239.
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. 1996. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: Revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87:4990–4997.
- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. 2008. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 352:804–815.
- Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. 1997. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 89:2516–2522.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1910–1916.
- Glassman AB, Hayes KJ. 2005. The value of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 158:88–91.
- Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. 2007. Comprehensive genetic characterization of CLL: A study of 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVH status and immunophenotyping. *Leukemia* 21:2442–2451.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. 2008. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines. *Blood* 111:5446–5456.
- Julliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Cuneo A, Knuutila S, Elonen E, Gahrton G. 1990. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 323:720–724.
- Matutes E, Carrara P, Coignet L, Brito-Babapulle V, Villamor N, Wotherspoon A, Catovsky D. 1999. FISH analysis for BCL-1 rearrangements and trisomy 12 helps the diagnosis of atypical B cell leukaemias. *Leukemia* 13:1721–1726.
- Muñoz L, Lasa A, Carricondo MT, Hernandez C, Ubeda J, Nomdedeu JF. 2007. Comparative analysis of ZAP-70 expression and Ig VH mutational status in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 72:96–102.
- Moreno C, Montserrat E. 2008. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 22:211–219.
- Nelson BP, Gupta R, Dewald GW, Paternoster SF, Rosen ST, Peterson LC. 2007. Chronic lymphocytic leukemia FISH panel: Impact on diagnosis. *Am J Clin Pathol* 128:323–332.
- Reddy KS. 2006. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol* 132:705–722.
- Sanchez J, Aventin A. 2007. Detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia increased by interphase fluorescence in situ hybridization in tetradecanoylphorbol acetate-stimulated peripheral blood cells. *Cancer Genet Cytogenet* 175:57–60.

3.2.3. Deleció 13q14 (Estudi IV)

3.2.3.1. Pacients i tipus de deleció

S'han seleccionat els 101 pacients de LLC dels estudis II i III que mitjançant la I-FISH-TPA van presentar una deleció 13q14 (**figura 23, pàgina 88**). Es van analitzar en el moment del diagnòstic 51 pacients i els 50 restants en el seguiment de la malaltia.

D'aquests, 90 presenten la deleció 13q14 com única alteració, i 11 presenten altres alteracions com (13q)+del(11q) en 5 pacients i del(13q)+del(17p) en 6 pacients.

En 79 (78%) la deleció va ser monoal·lèlica i en els 22 (22%) pacients restants bial·lèlica. A la **figura 26** s'observen tres nuclis interfàsics mostrant els patrons d'hibridació amb la sonda que marca el locus DLEU(13q14) en vermell i el telòmer 13q verd. Un nucli normal (A) presenta dos senyals d'hibridació vermells i dos verds, un nucli amb deleció monoal·lèlica 13q14 (B) perd un dels senyals vermells, i un nucli amb deleció bial·lèlica (C) perd els dos senyals vermells.

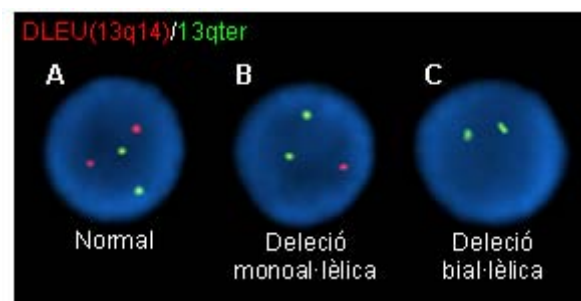


Figura 26. Nuclis interfàsics amb la sonda DLEU(13q14)/13qter mostrant diferents patrons d'hibridació.

3.2.3.2. Comprovació i estudi de la deleció en metafase

Realitzant les bandes G i la met-FISH, es van obtenir més de 15 metafases en 95 (94%) dels casos i no es van obtenir metafases en 6 (6%). Les metafases van ser informatives per la deleció en 90 casos, però no es va poder valorar el tipus degut a la presència de cariotips normals no corresponents a la clona tumoral en 5 casos. En quant a la mida de la deleció, en metafase s'observa una deleció 13q14 submicroscòpica en 62/90 (69%), gran i visible amb bandes G en 16/90 (18%) i submicroscòpica associada a translocació en 12/90 (13%) pacients.

3.2.3.3. Relació entre la mida de la deleció i el nombre d'al·lels delecionats

Tenint en compte el nombre d'al·lels delecionats i la relació amb la mida de la deleció 13q14 (**taula 18**), dins les monoal·lèliques 47/69 (68%) pacients presenten una deleció submicroscòpica, 16/69 (23%) pacients una deleció gran visible per CC i 6/69 (9%) pacients una deleció submicroscòpica associada a translocació. Dins els casos amb deleció bial·lèlica, 15/21 (71%) pacients la presenten submicroscòpica i 6/21 (29%) submicroscòpica associada a translocació.

Taula 18. Classificació de la deleció 13q14 segons la mida i associació a translocació i el nombre d'al·lels delecionats.

Tipus del(13q14)	Monoal·lèlica, n (%)	Bial·lèlica, n (%)	Total
Submicroscòpica	47 (68)	15 (71)	62
Gran	16 (23)	0 (0)	16
Sub+translocació	6 (9)	6 (29)	12
Total	69	21	90

3.2.3.4. Relació entre la mida de la deleció i associació a altres anomalies

En 73/90 (81%) pacients la deleció 13q14 es troba com a única alteració i en 17/90 (19%) pacients associada amb altres alteracions (**taula 19**). La deleció submicroscòpica s'observa com única alteració en 52 (71%) pacients i en 10 (59%) pacients es presenta amb altres alteracions. La deleció 13q14 gran visible amb bandes G s'observa com única alteració en 12 (17%) pacients i en 4 pacients (23%) es presenta amb altres alteracions. La deleció 13q14 associada a translocació s'observa com única alteració en 9 (12%) pacients i en 3 (18%) es presenta amb altres alteracions.

Taula 19. Classificació de la deleció 13q14 segons la mida i l'associació a altres anomalies.

Tipus del(13q14)	Única, n (%)	+altres, n (%)	Total
Submicroscòpica	52 (71)	10 (59)	62
Gran	12 (17)	4 (23)	16
Sub+translocació	9 (12)	3 (18)	12
Total	73	17	90

3.2.3.5. Delecions submicroscòpiques 13q14 associades a translocació

Els pacients amb delecio monoal·lèlica associada a translocació 4 s'han estudiats al diagnòstic i 2 en el seguiment, i els pacients amb delecio bial·lèlica associada a translocació 2 s'han estudiat al diagnòstic i 4 en el seguiment. El cariotip d'aquests pacients i el percentatge de nuclis patològics per I-FISH es mostren a la **taula 20**. En 5 dels casos la delecio associada a translocació s'afegeix al cariotip com subclona de la clona amb delecio 13q submicroscòpica o gran.

Taula 20. Dades citogenètiques dels pacients amb delecio 13q14 submicroscòpica associada a translocació.

Cas	I-FISH % mono/bial·lèlica	Cariotip
1	60	46,XY,der(1)t(1;13)(q21;q14)inv(1)(q42q21)[13]/46,XY[7] ^{NL}
2	15/45	46,XX,t(1;5;13)(p36;q31;q14)[4] ^b /46,XX[33] ^{m,b,NL}
3	25/38	46,XX,t(4;13)(q22;q14)[2] ^{m,b} /45,idem,t(4;17)(q10;q10)[15] ^{m,b} /46,XX[2] ^{NL}
4	84	46,XX,t(9;13)(q21;q14)[3]/46,XX,der(9)add(9)(p?)t(9;13)(q21;q14)[2]/46,XX,del(13)(q14q21)[6]/46,XX[20] ^{NL}
5	11/78	46,XX,t(1;13)(p36;q14-21)[2] ^b /46,XX,t(13;Z)(13q14;?) [2] ^b /46,XX,del(13)(q14q21)[2] ^M /46,XX[25] ^{m,b}
6	34	46,XX,t(4;13)(q32;q13-14)[3]/46,XX[17] ^{NL}
7	22/63	46,XY,t(9;13)(q31;q14-21)[15] ^{m,b} /46,XY[5] ^{m,b,NL}
8	56	46,XY,t(10;13)(q24;q14)[4]/46,XY[20] ^{NL}
9	49/34	46,XY,del(11)(q14qter)[8] ^{m,b} /46,XY,t(1;13)(p22-31;q14)[2] ^{m,b} /46,XY[8] ^{m,b,NL}
10	3/51	46,XX,t(8;13)(p12;q14)[2] ^b /46,XX[16] ^{NL}
11	83	46,XY,t(10;13)(p14-15;q12)[4]/45,idem,t(17;20)(p12;p12)[2]/45,idem,t(4;17)(q10;q10)[1]/45,idem,t(14;17)(q10;q10)[1]/45,idem,-17,add(17)(p12)[2]/46,XY[40] ^{NL}
12	84	46,XY,t(13;20)(q14;q12)[14]/46,XY[1] ^{NL}

^m, met-FISH amb una clona amb delecio submicroscòpica monoal·lèlica; ^b, met-FISH amb una clona amb delecio submicroscòpica bial·lèlica; ^M, met-FISH amb una clona amb delecio gran monoal·lèlica; ^{NL}, met-FISH amb una clona normal.

3.2.3.5.1. Translocacions implicant 13q14 no descrites

Dels 12 casos amb delecio submicroscòpica 13q14 sociada a translocació, 4 no han estat descrites prèviament. Les **figures 27-30** mostren els cariotips i les imatges de FISH d'aquestes que són: der(1)t(1;13)(q21;q14)inv(1)(q42q21) (cas 1), t(1;5;13)(p36;q31;q14) (cas 2), t(9;13)(q31;q14-21) (cas 7) i t(10;13)(p14-15;q12) (cas 11) (**taula 20**).

El cas 1 (**figura 27**): (A) Cariotip d'un home amb $t(1;13)$. (B) La met-FISH amb les sondes de pintat cromosòmic 13 (verd) i 1 (vermell) (C) van confirmar la translocació recíproca. (D) La sonda locus específica 1p/1q (verda/vermella) va identificar una inversió del cromosoma 1 en translocar-se. (E) La sonda telomèrica 1q (vermella) descarta la pèrdua del telòmer 1q en la translocació amb inversió $der(1)t(1;13)(q21;q14)inv(1)(q42q21)$.

El cas 2 (**figura 28**): (A) Cariotip d'una dona amb els cromosomes 1p+, 13q- i 5q-, suggerint una translocació implicant tres cromosomes. (B) La met-FISH amb la sonda locus específica 1p/1q (verda/vermella) i el pintat cromosòmic 13 (verd) (B) va demostrar que en la translocació estava implicat un tercer cromosoma. (C) La sonda locus específica 5q/5p (vermella/verda) va confirmar la translocació $t(1;15;13)(p36;q31;q14)$.

Els cas 7 (**figura 29**): (A) cariotip d'un home amb una $t(9;13)$. (B) La FISH en metafase amb la sonda locus específica 9q (vermella) i el pintat cromosòmic 13 (verd) va confirmar la $t(9;13)(q31;q14-21)$.

El cas 11 (**figura 30**): (A) Cariotip d'un home amb un cromosoma 10p+ i un petit suggestiu de 13q-. (B) La FISH en metafase amb els pintats cromosòmics 10 (vermell) i 13 (verd) van confirmar la translocació recíproca $t(10;13)(p14-15;q12)$. Aquest cas a més, va presentar translocacions *jumping* implicant el cromosoma 17 amb altres *partners*, en aquest cas el cromosoma 4.

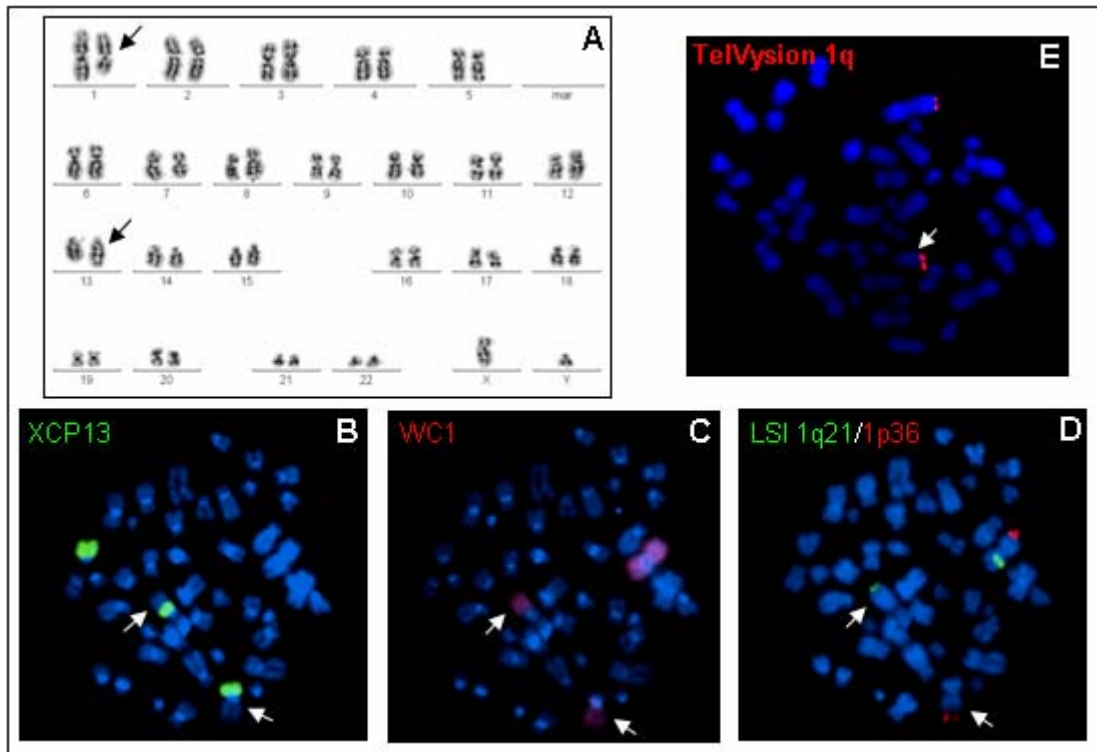


Figura 27. Cas 1. Cariotip (A) i FISH seqüencial amb les sondes XCP13 (B), WC1 (C) i LSI 1q21/1p36 mostrant una $t(1;13)(q21;q14)$ associada a $inv(1)$ (D), conservant els telòmers 1q (E). Les fletxes indiquen els cromosomes implicats en la translocació.

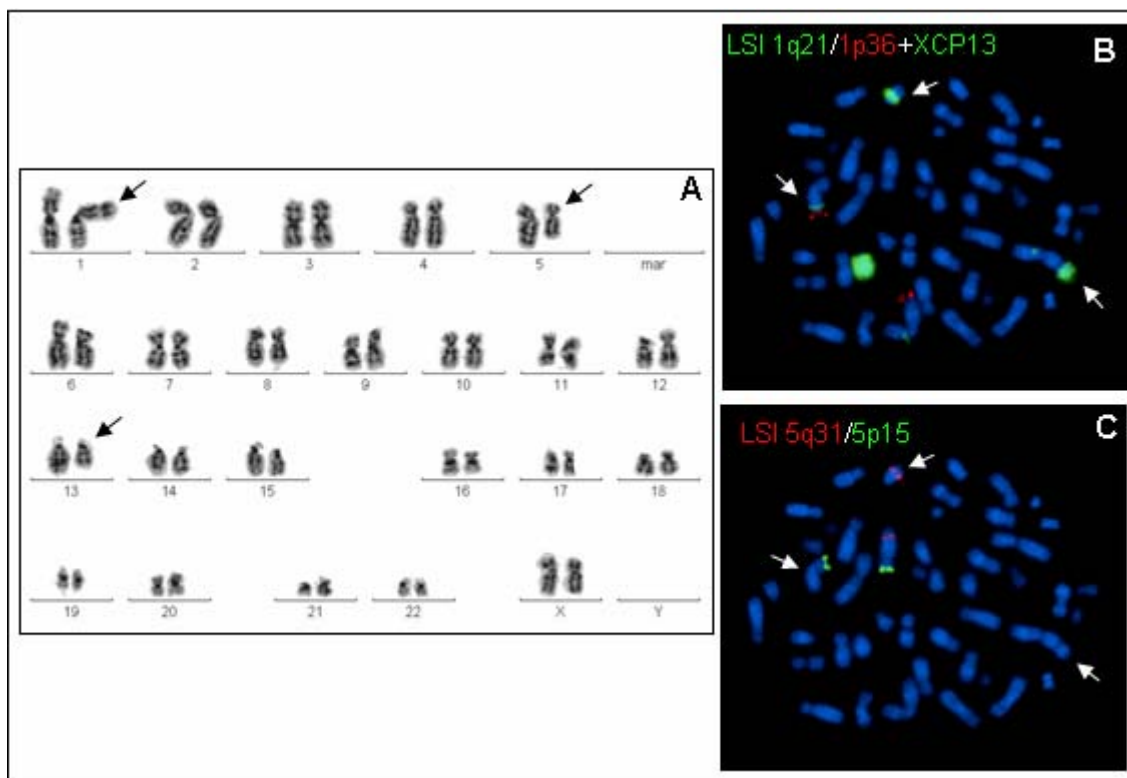


Figura 28. Cas 2. Cariotip (A) i imatges de FISH seqüencial amb les sondes LSI 1q21/1p36 i XCP13 (B). La sonda LSI 5q31/5p15 (C) confirma la translocació triple $t(1;5;13)(p36;q31;q14)$. Les fletxes indiquen els cromosomes implicats en la translocació.

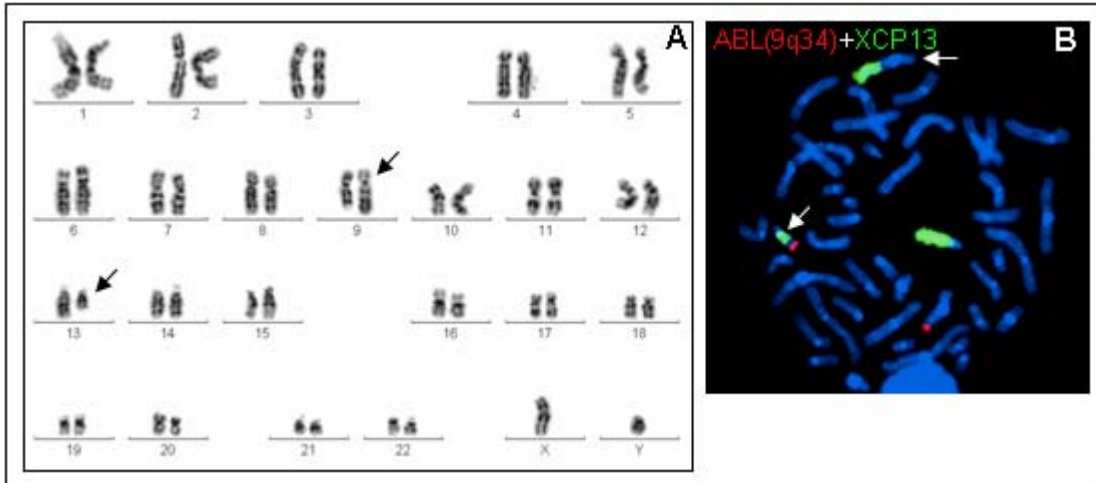


Figura 29. Cas 7. Cariotip (A) i imatge de FISH (B) amb les sondes ABL(9q34) i XCP13 mostrant una t(9;13)(q31;q14-21). Les fletxes indiquen els cromosomes implicats en la translocació.

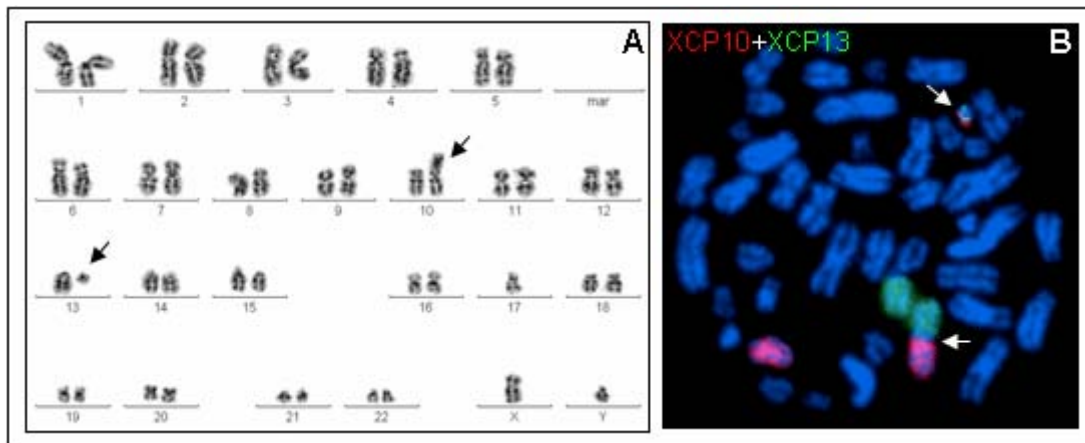


Figura 30. Cas 11. Cariotip (A) i imatge de FISH amb les sondes XCP10 i XCP13 (B) mostrant la t(10;13)(p14-15;q12). Les fletxes indiquen els cromosomes implicats en la translocació.

3.3. NEOPLÀSIES DE CÈL·LULES PLASMÀTIQUES

3.3.1. Detecció d'alteracions cromosòmiques mitjançant I-FISH en cèl·lules plasmàtiques purificades vs. I-FISH en cultius de MO (Estudi V)

3.3.1.1. Pacients

S'ha realitzat la separació immunomagnètica de CP mitjançant partícules MACS en 221 pacients i mitjançant la I-FISH en CP (I-FISH-CP) s'ha estudiat la presència d'alteracions del cromosoma 13. En 87/221 (39%) dels pacients s'ha identificat una deleció 13q14 o monosomia 13. S'ha considerat la monosomia com la deleció 13q14 + deleció 13q34. S'han seleccionat 61 pacients, 2 diagnosticats de GMSI i 59 de MM, 32 d'ells estudiats en el diagnòstic i 29 en el seguiment de la malaltia, que mitjançant I-FISH-CP han presentat alteracions del cromosoma 13 i dels quals també es disposava de cultiu de MO amb o sense l'estimulant TPA (**figura 24, pàgina 89**). S'ha realitzat també la I-FISH preparacions que procedien del cultiu de MO (I-FISH-MO) i s'han comparat el nombre de nuclis patològics observats en ambdues metodologies.

En tots els pacients, s'ha realitzat el recompte de CP en extensions de MO tenyides amb MGG, per tal d'avaluar el percentatge de CP de cada mostra. El percentatge mitjà de CP en MO va ser del 28% (rang 6-95%) (**taula 21**).

Taula 21. Dades biològiques i genètiques dels 61 pacients.

% CP, mediana (rang)	28 (6-95)
Deleció 13q14, n (%)	11 (18)
Deleció 13q14+13q34, n (%)	50 (82)
% nuclis patològics I-FISH-CP, $\bar{X} \pm SD$	73 \pm 21,3
% nuclis patològics I-FISH-MO, $\bar{X} \pm SD$	10 \pm 10,3
Casos patològics I-FISH-CP, n (%)	61 (100)
Casos patològics I-FISH-MO, n (%)	16 (26)

3.3.1.2. Detecció d'alteracions i comparació dels resultats de I-FISH en cèl·lules plasmàtiques vs. I-FISH en cultiu de MO

Mitjançant I-FISH-CP s'ha observat una del(13q14) en 11/61 (18%) dels pacients i una del(13q14)+del(13q34) en 50/61 (82%) dels pacients i el percentatge mitjà de nuclis patològics observat és del $73\% \pm 21,3\%$, i l'observat mitjançant I-FISH-MO és del $10\% \pm 10,3\%$ (**taula 21**).

S'ha comparat el percentatge de nuclis anòmals obtingut en la I-FISH-CP i en la I-FISH-MO mitjançant la correlació de Pearson ($r=0,390$ i $P=0,002$) (**figura 31**). S'observa que a mida que augmenta el percentatge de nuclis patològics amb la I-FISH-CP, en la majoria dels casos el percentatge de nuclis patològics en la I-FISH-MO es situa per sota del valor de positivitat ($cut-off \geq 11\%$, **taula17, pàgina 96**). Mentre que tots els pacients seleccionats presenten alteracions dels cromosoma 13 amb la I-FISH-CP ($cut-off \geq 20\%$), mitjançant la I-FISH-MO únicament en 16/61 (26%) dels pacients van ser patològics (**taula 21**). No s'han observat diferències entre els resultats de I-FISH-MO sense estimular i estimulats amb TPA.

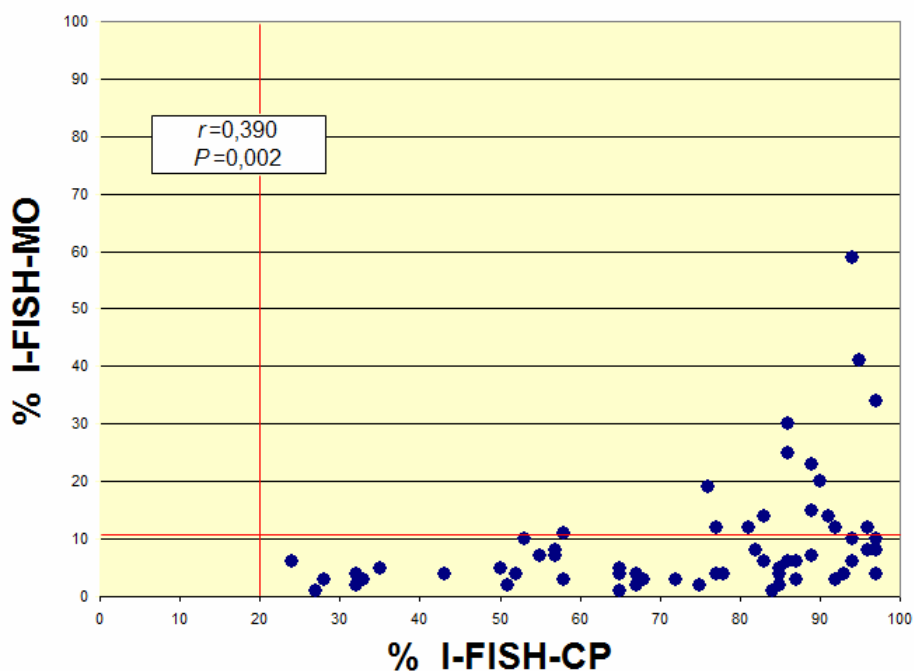


Figura 31. Comparació del percentatge de nuclis anòmals per I-FISH en cultiu de MO i en CP mitjançant la correlació de Pearson. Les línies vermelles indiquen els *cut-off*.

3.3.1.3. Detecció d'alteracions mitjançant I-FISH en cultiu de MO en relació al recompte de cèl·lules plasmàtiques

S'ha relacionat recompte de CP en extensió de MO tenyides amb MGG amb el nombre de casos patològics mitjançant I-FISH-MO (**taula 22**). Els pacients s'han classificat en 3 categories en funció del recompte de CP. En el grup de baix percentatge de CP (6-24%) cap dels casos va ser positiu mitjançant I-FISH-MO, en el grup de percentatge intermedi de CP (25-40%) 5 dels casos van ser positius per I-FISH-MO i en el grup d'alt percentatge de CP (41-95%) 11 dels casos van presentar alteracions del cromosoma 13 mitjançant I-FISH-MO. Només el 25% dels casos amb un percentatge intermedi de CP i el 65% dels casos amb un percentatge alt de CP són detectats com patològics mitjançant I-FISH-MO.

Taula 22. Freqüència de casos patològics per I-FISH-MO en relació al recompte de CP en MO realitzat prèviament.

% CP	n	Casos anòmals I-FISH-MO, n (%)
6-24	24	0 (0)
25-40	20	5 (25)
41-95	17	11 (65)

4. DISCUSSIÓ

4.1. LLA-B

4.1.1. Identificació de noves translocacions amb implicació del gen *IGH*

La LLA-B es caracteritza per la presència de determinades alteracions cromosòmiques recurrents que, segons la classificació de la WHO, per sí mateixes donen entitat pròpia a la leucèmia diferenciant-la de la resta per mostrar un comportament clínic concret. Translocacions com la $t(9;22)(q34;q21)/BCR-ABL1$, la $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$, les translocacions de $11q23/MLL$ amb diferents *partners*, $t(1;19)(q23;p13.3)/TCF3-PBX1$ o un cariotip hipo/hiperdiploide entre d'altres determinen en la LLA-B un pronòstic i evolució dels pacients ben definits (WHO 2008). Les translocacions amb implicació del gen *IGH* són freqüents en les neoplàsies de limfòcits B madurs però són rares en la LLA-B. A l'estudi I s'han identificat dues translocacions amb implicació del gen *IGH* amb dos nous *partners*: la $t(2;14)(q14.3;q32)$ i la $t(14;17)(q32;q21)$.

Importància de la FISH i altres tècniques en la detecció de noves translocacions

La FISH amb la sonda comercial *IGH breakapart* va confirmar la implicació del gen. Aquesta tècnica de citogenètica molecular és un mètode fàcil i efectiu per a la detecció de translocacions del gen *IGH* (Harrison *et al.* 2010), i en metafase, permet localitzar els *partners* contribuint a la identificació de nous gens implicats en la transformació leucèmica. Aquesta sonda marca la regió telomèrica del segment C del gen *IGH* amb un fluorocrom i la regió telomèrica del segment V del gen amb un altre fluorocrom. En la normalitat, els dos fluorocroms es troben físicament adjacents, però quan es dona una translocació, l'extrem telomèric es desplaça des del cromosoma 14 fins al nou *partner* produint una senyal d'*split*. Seria recomanable realitzar un *screening* de FISH amb la sonda per tal de detectar de translocacions de *IGH*, ja que com s'ha observat, aquestes de vegades són críptiques.

En els últims anys, estudis de FISH i de clonatge molecular han identificat noves translocacions de *IGH* que involucren importants gens del desenvolupament hematopoètic, observant-se en el 4% en nens i 11% en adults en la LLA-B (Russell *et al.* 2012; Moorman *et al.* 2012). Mitjançant aquestes tècniques s'ha descrit que en la t(14;17)(q32;q21) el gen que cau sota la regulació del promotor de *IGH* és el *IGF2BP1* (*insuline-like growth factor 2 mRNA binding protein 1*) (Dyer *et al.* 2010). Aquest gen principalment s'expressa durant el desenvolupament embrionari i codifica una proteïna d'unió a l'ARN que rarament s'expressa en l'adult. Altres gens de la mateixa família, com *IGFBP1* i *IGFBP3*, estan relacionats amb la patogènia de determinats càncers agressius com el carcinoma ovàric o altres neoplàsies com el liposarcoma, el càncer de fetge o l'adenocarcinoma d'endometri. Es pensa que en LLA-B podria incrementar la traducció de proteïnes oncogèniques (Bell *et al.* 2013). En la t(2;14)(q14.3;q32) no s'ha aconseguit identificar l'altre gen implicat.

Malgrat la raresa de les translocacions de *IGH* en la LLA-B, s'ha descrit que les translocacions críptiques t(X;14)(p22;q32) o t(Y;14)(p11;32) implicant en gen *CRLF2* serien les més freqüent, seguides per les translocacions amb gens de la família *CEBP* (19q13/*CEBPA-CEBPG*, 20q13/*CEBPB*, 8q11/*CEBPD* i 14q11/*CEBPE*), t(14;18)(q32;q21)/*BCL2* (identificada més recentment) i t(6;14)(p22;q32)/*ID4*. Aquestes translocacions a nivell molecular són específiques de la LLA-B, i no s'observen en les hemopaties malignes de limfòcits madurs a excepció de la t(14;18)/*BCL2*. La resta de casos semblen ser més esporàdics (Dyer *et al.* 2010; Chapiro *et al.* 2013).

Característiques clínico-biològiques de les translocacions amb implicació del gen IGH

Aquestes translocacions acostumen a presentar-se en major incidència en pacients adolescents i adults joves, com és el cas dels pacients descrits, reflectint que tenen un origen post-natal més que fetal, i amb un recompte de leucòcits baix i immunofenotip comú/pre-B (Harrison 2009). Els casos exposats són dos pacients adolescents. El

pacient amb la t(2;14)(q14.3;q32) va ser diagnosticat al setembre 2005 i va iniciar la teràpia d'inducció seguint el protocol PETHEMA de la LLA-B. Al novembre del 2006 va recaure i es va sotmetre a transplantament al·logènic de MO aconseguint la remissió completa, però a finals del 2009 va ser èxitus. El pacient amb la t(14;17)(q32;q21)/*IGF2BP1* es va diagnosticar al maig del 2004 i va seguir el protocol ALL-99 SHOP aconseguint la remissió completa. En l'últim seguiment que consta del juliol del 2011 el pacient es trobava lliure de malaltia.

Proposta d'un nou subgrup dins la classificació de la WHO

La identificació de les translocacions t(2;14)(q14.3;q32) i t(14;17)(q32;q21) contribueix a la creació dins la LLA-B d'un nou subgrup de pacients amb translocació implicant el gen *IGH* que es presenta en adolescents i adults joves. Aquestes translocacions amb heterogeneïtat de *partners* impliquen nous mecanismes leucèmics que poden ser diana de noves teràpies. Ara per ara, la importància clínica d'aquestes translocacions no està ben definida degut a la poca incidència en la que apareixen individualment, a que els pacients han estat seleccionats de diferents centres al llarg dels anys i han seguit diferents protocols de tractament. A més, el pronòstic estaria relacionat amb el segon gen implicat i sembla, que la translocació amb determinats *partners* com *CLRF2* podrien determinar una pitjor evolució (Moorman *et al.* 2012). Són necessaris més estudis prospectius per aclarir el seu pronòstic (Dyer *et al.* 2010; Harrison 2011; Chapiro *et al.* 2013).

4.2. LLC

4.2.1. Limitacions de l'anàlisi citogenètica convencional i importància de la FISH en interfase en la detecció d'alteracions

En els darrers anys, l'anàlisi CC es va deixar de banda en el diagnòstic rutinari de la

LLC. El fet que aquesta sigui una hemopatia de limfòcits B madurs ha limitat l'anàlisi CC degut a la dificultat dels limfòcits a dividir-se i l'escassa obtenció de metafase inclús amb mètodes d'estimulació cel·lular clàssics com la PHA, el PWM, el lipopolisacàris o el TPA, i a la baixa resolució per a determinades alteracions cromosòmiques, en favor de la I-FISH, més sensible però restringida a les sondes d'ADN seleccionades. L'aplicació de la I-FISH amb sondes de regions cromosòmiques particularment propenses a alterar-se, identificades gràcies als estudis de CC, han solventat aquestes limitacions. Diferents estudis confirmen que la I-FISH identifica més alteracions cromosòmiques que el cariotip (Dohner *et al.* 1999; Chena *et al.* 2003; Aoun *et al.* 2004; Van Dyke *et al.* 2007). La I-FISH aplicada juntament amb la tècnica de separació de CMGD ha esdevingut la metodologia estàndard emprada en el diagnòstic citogenètic i pronòstic d'aquests pacients, per ser una metodologia fàcil que no necessita cultivar cèl·lules ni que aquestes estiguin en divisió.

4.2.2. Detecció d'alteracions cromosòmiques i comparació dels resultats de la I-FISH en cultius estimulats amb TPA vs. I-FISH en cèl·lules mononucleades separades per gradient de densitat.

En els estudis II i III s'ha comparat la I-FISH en CMGD amb la I-FISH en cultius estimulats amb TPA per a la detecció d'alteracions cromosòmiques.

En l'estudi II, la mitjana de nuclis patològics observats mitjançant I-FISH-TPA és significativament superior que la observada per I-FISH-CMGD (39% vs. 10%, $P < 0.001$). La I-FISH-TPA ha detectat un 78% d'alteracions clonals vs. 51% de la I-FISH-CMGD, identificant 15 casos discrepants alteracions cromosòmiques que han passat desapercebudes mitjançant les CMGD. En la comparació en paral·lel de l'estudi III, la taxa de detecció de la I-FISH-TPA és del 80% vs. 57% de la I-FISH-CMGD ($P = 0.014$) i s'han identificat 13 casos discrepants.

En la comparació històrica de l'estudi III, s'ha comparat la detecció d'alteracions en dos grups independents de pacients separats en el temps, el grup de I-FISH-CMGD estudiats durant els primers anys de diagnòstic citogenètic de la LLC i el grup de I-FISH-TPA estudiats durant els darrers anys. S'han detectat més alteracions cromosòmiques en el grup de I-FISH-TPA que en el grup de I-FISH-CMGD (67% vs. 46%, $P=0.006$). La taxa de detecció de les delecions 11q23, 17p13 i trisomia 12 és similar en els dos grups, però la detecció de la delecio 13q14 és més freqüent mitjançant I-FISH-TPA (10% vs. 37%, $P=0.006$).

Importància de la I-FISH en cultius estimulats amb TPA en relació a la detecció d'alteracions

Els resultats dels estudis II i III indiquen que la I-FISH-TPA incrementa el percentatge de nuclis patològics quan es compara amb la I-FISH-CMGD. Aquest increment es podria explicar per l'efecte estimulador del TPA sobre els limfòcits B, induint-los a sortir de l'estadi de quiescència i dividir-se, o a que la metodologia de CMGD és menys efectiva del que s'esperava. Els casos discrepants normals mitjançant CMGD però patològics en la I-FISH-TPA, poden ser deguts a que la resta de tipus cel·lulars obtinguts en la fracció de CMGD com els limfòcits T o els limfòcits B no leucèmics han emmascarat els limfòcits B tumorals i per tant no s'han detectat les alteracions. En la comparació històrica l'augment d'alteracions cromosòmiques en el grup més recent de pacients estudiats mitjançant I-FISH-TPA es creu que és deguda a l'efecte estimulador del TPA i no a un increment de mutacions al llarg dels anys. Possiblement, dins del grup de pacients més antic hi ha pacients considerats normals que tenen emmascarada una delecio 13q14 que no s'hauria detectat per no tenir un recompte de limfòcits suficientment alt. En aquests casos normals, seria convenient realitzar l'estudi de FISH durant seguiment de la malaltia per tal de detectar les alteracions que no hagin estat identificades.

En la revisió de la literatura gairebé no existeixen publicacions que facin menció a la

utilització cèl·lules estimulades amb TPA per a la I-FISH, ni que es compari amb la I-FISH en CMGD. Fins on tenim constància, només la publicació d'un altre grup fa referència als resultats de l'estudi II (el-Taweel *et al.* 2009) que compara en 46 pacients la I-FISH en CMGD i en cultius estimulats amb TPA amb o sense IL2 per tal d'avaluar quina és la millor metodologia en el diagnòstic citogenètic de la LLC. El-Taweel *et al.* obtenen resultats equivalents en la I-FISH en cultius estimulats i la I-FISH-CMGD amb percentatges de nuclis patològics similars. Només 4 casos van ser discordants però tots tenien una clona tumoral petita amb resultats propers al valor de positivitat. Aquests resultats no es correlacionen amb els de l'estudi II però tampoc són contraris ja que, l'equivalència de resultats permet utilitzar una mateixa mostra de SP estimulada per realitzar tant l'estudi de I-FISH, com l'anàlisi CC o la met-FISH. Per explicar aquestes diferències s'haurien d'analitzar els protocols de separació de CMGD i cultius cel·lulars emprats, el recompte de limfòcits dels pacients, així com la variabilitat inter/intraobservador a l'hora de valorar els resultats de I-FISH. Segons els resultats dels estudis II i III, la I-FISH-TPA és un mètode fiable de detecció de les alteracions cromosòmiques.

Importància de la FISH en metafase

Les alteracions identificades mitjançant I-FISH-TPA han pogut ser confirmades en metafase gràcies a l'estimulació generada pel TPA, contràriament al que succeeix amb les CMGD que només es poden analitzar en interfase. Però, moltes de les alteracions probablement no s'haurien confirmat utilitzant només la CC. Ha estat necessària la utilització de la met-FISH per confirmar la majoria de les delecions 13q14 i alguns casos amb delecio 11q23 ja que s'ha publicat anteriorment (Stockero *et al.* 2006), els pacients poden presentar un cariotip normal però amb delecions submicroscòpiques només detectables per met-FISH. Per altra banda, els casos que presenten poques metafases patològiques, en contrast amb un elevat nombre de nuclis patològics, pot ser degut a que existeix un predomini de metafases de limfòcits no leucèmics i a la

dificultat en l'obtenció de metafases dels limfòcits tumorals. En cap cas es pensa que el TPA sigui un inductor de les anomalies cromosòmiques, ja que en els controls de SP utilitzats no s'han identificat aquestes alteracions.

Comparació de les metodologies de separació de cèl·lules mononuclears per gradient de densitat i cultius estimulats amb TPA

L'estimulació dels cultius de SP amb el mitògen TPA contribueix a incrementar el percentatge de nuclis patològics i augmentar la detecció d'alteracions cromosòmiques. A més, permet realitzar un estudi de CC per confirmar les alteracions identificades en la I-FISH i valorar globalment el cariotip amb la mateixa mostra. Aquesta metodologia és fàcilment aplicable a la rutina del laboratori i dona opció a realitzar estudis de CC, I-FISH i met-FISH. En canvi, la separació de CMGD és una tècnica que, encara que és de fàcil realització i es poden obtenir els resultats en un temps molt inferior, se surt de la rutina diària del cultiu cel·lular requerint més recursos de personal i en el nostre cas, tal com els resultats indiquen, no és una metodologia del tot satisfactòria. A més, limita l'estudi únicament a la interfase.

4.2.3. Valoració del recompte de limfòcits absolut

En l'estudi II s'ha observat que els 15 casos discordants patològics només mitjançant I-FISH-TPA presenten una lleugera limfocitosi, inferior a la resta dels pacients. L'anàlisi estadística indica que un recompte de limfòcits absolut inferior a $8,7 \times 10^9/L$ és un valor crític per sota del qual és recomanable realitzar la tècnica de I-FISH-TPA en lloc de la I-FISH-CMGD ($P = 0.037$). En la comparació en paral·lel de l'estudi III, s'observa que el recompte de limfòcits absolut mitjà en els casos discrepants és inferior a la resta ($8,5 \times 10^9/L$ vs. $25,5 \times 10^9/L$, $P < 0.001$). En la comparació històrica, els pacients amb deleció 13q14 del grup TPA tenen un recompte de limfòcits inferior als que tenen la deleció en el grup de CMGD ($14,5 \times 10^9/L$ vs. $42 \times 10^9/L$, $P = 0.038$).

Importància de la I-FISH en cultius estimulats amb TPA en relació al recompte de limfòcits

Els casos discrepants presenten un recompte de limfòcits baix i per tant pocs limfòcits leucèmics que podrien quedar emmascarats entre els altres tipus cel·lulars i necessitarien ser estimulats per ser detectats. En canvi, en la resta dels casos la població de limfòcits tumorals és més elevada i les alteracions possiblement es detectin més fàcilment sense la necessitat d'estimulació. Els resultats suggereixen que l'estudi amb TPA identifica les alteracions en un estadi més inicial de la malaltia amb un recompte de limfòcits inferior i les CMGD en estadis més avançats amb un recompte de limfòcits superior.

4.2.4. Comparació de la SLT i SG mitjançant I-FISH en cultius estimulats amb TPA i en cèl·lules mononucleades separades per gradient de densitat

Fent un pas més per avaluar la utilitat del TPA per a l'estudi interfàsic de la LLC, s'ha analitzat si la diferència en els resultats entre la I-FISH en cultius estimulats amb TPA i en CMGD té implicacions clíniques rellevants pel que fa a la SLT i SG.

En la comparació en paral·lel de l'estudi III la I-FISH-TPA ha millorat la predicció de la SLT comparada amb la I-FISH-CMGD ($P = 0.031$ vs. 0.166) i millora la predicció de la SG ($P = 0.007$ vs. 0.017) com s'observa per una millor separació de les corbes de supervivència.

En la comparació històrica de l'estudi III analitzant en detall els pacients amb i sense deleció 13q14, els pacients del grup de I-FISH-CMGD amb deleció 13q14 tenen una SLT més curta que els pacients normals (18 vs. 107 mesos, $P = 0.026$), i els pacients del grup de I-FISH-TPA amb deleció tenen una SLT similar als normals (132 mesos vs. no aconseguida, $P = 0.498$). Cal remarcar que els pacients del grup I-FISH-CMGD tenen més temps de seguiment de la malaltia que els I-FISH-TPA degut a que són

pacients més antics. Per altra banda, no s'observen diferències significatives entre la SLT dels pacients amb deleció 13q14 bial·lèlica i monoal·lèlica.

Valor pronòstic de la I-FISH en cultius estimulats amb TPA

Mitjançant la I-FISH-CMGD Döhner *et al.* van determinar un model jeràrquic per el qual la SLT de les delecions 17p13, 11q23, trisomia 12, FISH normal i deleció 13q14 com única alteració s'establia en 9, 13, 33, 49 i 92 mesos, respectivament (Döhner *et al.* 2000), per tant, l'absència d'alteracions o la deleció 13q14 es consideren de bon pronòstic, la trisomia 12 i deleció 11q23 de intermedi/mal pronòstic i la deleció 17p13 de mal pronòstic. En la comparació en paral·lel de l'estudi III s'han identificat 13 casos discrepants normals mitjançant I-FISH-CMGD però amb alteracions en la I-FISH-TPA. D'aquests, 8 casos van presentar una deleció 13q14 i, si seguim el model de Döhner *et al.* aquests pacients no van canviar de grup pronòstic. Però els 5 casos restants van canviar de grup pronòstic passant de bon pronòstic a intermedi/mal pronòstic per presentar trisomia 12 o deleció 11q23. Aquests canvis de grup pronòstic detectats gràcies l'estimulació amb TPA han permès una millor predicció de la SLT i SG. A més, l'evolució d'aquests pacients s'ajusta més a les alteracions cromosòmiques identificades mitjançant la I-FISH-TPA. Concretament, dos dels pacients en els que es va identificar la deleció 11q23 presentaven les adenopaties típiques de l'alteració i van requerir tractament. Habitualment, en els pacients amb delecions de *P53* i *ATM* s'observa un estadi més avançat de la malaltia que la resta per la presència d'esplenomegàlia, adenopaties i símptomes B. Analitzant en detall els pacients amb deleció 13q14, mitjançant I-FISH-CMGD s'observen en el 10% i tenen una SLT més curta que els normals, i mitjançant I-FISH-TPA s'observa en el 37% dels pacients i tenen una SLT similar als normals. Aquest resultat és similar a la freqüència observada per Döhner *et al.* en CMGD que descriuen un 36% de casos amb deleció 13q14 com única alteració, però en contrast, tenen una SLT més llarga que els normals (92 vs. 49 mesos). Donant explicació als factors d'aquestes discrepàncies es pot dir que el

diagnòstic mitjançant l'estimulació amb TPA s'ha realitzat en estadis més inicials de la malaltia i per aquest motiu presenten una SLT més allargada similar als pacients normals. En canvi, quan la tècnica de I-FISH-CMGD és capaç de detectar l'alteració, els pacients ja presenten un estadi més avançat de la malaltia amb una SLT inferior als pacients normals. Els resultats recolzen aquesta hipòtesi, ja que els pacients amb deleció 13q14 del grup TPA tenen un recompte de limfòcits inferior als del grup de CMGD, i els pacients del grup de CMGD amb deleció 13q14 van presentar un recompte de limfòcits més elevat.

Respecte a la SLT entre els pacients amb deleció 13q14 bial·lèlica i monoal·lèlica no observem diferències com succeeix en altres publicacions (Van Dyke, *et al.* 2010; Dal Bo *et al.* 2011) però, altres fan referència a pitjor supervivència (Dewald *et al.* 2003; Chena *et al.* 2008). És necessari valorar el pronòstic d'aquestes alteracions en un grup de pacients més ampli.

Importància de la metodologia utilitzada en la detecció d'alteracions

Des que Döhner *et al.* a l'any 2000 van establir grups pronòstic en funció de les alteracions cromosòmiques, és recomanable realitzar en els pacients de LLC un estudi de FISH en el diagnòstic o abans d'iniciar el tractament, principalment per identificar aquells pacients amb deleció de 17p13/*P53* que no responen al tractament convencional i que tenen una progressió ràpida i curta supervivència. Així, el iwCLL recomana l'estudi de I-FISH per al diagnòstic i tractament de la LLC (Hallek *et al.* 2008). En els darrers anys, ha cobrat importància la quantificació de la clona tumoral en l'evolució de la malaltia, conferint un pitjor pronòstic a aquells pacients amb un determinat percentatge de nuclis patològics (Catovsky *et al.* 2004, Rudenko *et al.* 2008; Hernandez *et al.* 2009; Van Dyke *et al.* 2010; Hernandez *et al.* 2011; Dal Bo *et al.* 2011). En els estudis II i III la clona tumoral va augmentar amb la utilització del TPA en molts dels casos però en 2 casos amb deleció de *P53*, el percentatge de nuclis patològics va disminuir. S'hauria d'analitzar en aquests casos l'efecte del TPA o inclús

la influència del temps de cultiu sobre els limfòcits amb deleció de *P53*, com succeeix en la LMC on el nombre de nuclis *BCR-ABL* positius varia en funció del temps de cultiu (Wilkens *et al.* 1999). En aquests casos o els que tinguin valors propers a la positivitat seria convenient realitzar més estudis citogenètics durant el seguiment de la malaltia per valorar l'evolució de la clona tumoral. Aquest és el primer estudi que avalua la importància clínica de la utilització de la I-FISH en cultius de SP estimulats amb TPA. A partir dels nostres resultats és important remarcar que s'ha de posar especial interès en la metodologia utilitzada a l'hora de realitzar nous assajos clínics basats en la quantificació de les cèl·lules en interfase.

4.2.5. Caracterització de les delecions 13q14

Malgrat la dificultat d'obtenir metafases en els pacients amb LLC, en l'estudi IV s'han seleccionat els pacients que han presentat una deleció 13q14 mitjançant I-FISH-TPA i s'ha realitzat el cariotip i la met-FISH del mateix botó cel·lular per caracteritzar l'heterogeneïtat d'aquestes delecions.

4.2.5.1. Obtenció de metafases en cultius de SP estimulats amb TPA

Mitjançant el cultiu de SP estimulat amb TPA hem obtingut més de 15 metafases en el 94% dels casos amb deleció 13q14 i només en el 6% l'estimulació amb TPA no ha estat exitosa. En 5 dels casos en que s'han obtingut metafases, les bandes G i la met-FISH són normals i per tant, no pertanyen a la clona de limfòcits B tumorals sinó que són metafases de limfòcits B o T normals o d'altres tipus cel·lulars de la SP. En el 89% dels casos les metafases han proporcionat informació del tipus de deleció 13q14.

Valoració de l'obtenció de metafases

La recerca continua dels mitògens més efectius en l'estimulació dels limfòcits B ha fet reprendre l'anàlisi CC en aquests pacients. Algunes publicacions situen la taxa

d'obtenció de metafases al voltant de 93% mitjançant estimulants com el CD40L (Buhmann *et al.* 2002; Mayr *et al.* 2006), o 95-98% amb els oligonucleòtids CpG combinat amb IL-2 (Dicker *et al.* 2006; Haferlach *et al.* 2007). Aquestes estudis detecten entre el 83%-89% de casos amb alteracions cromosòmiques. En el nostre cas però, no s'ha estudiat la taxa d'obtenció de metafases ni d'alteracions global ja que, hem analitzat en metafase únicament els pacients amb deleció 13q14. Si existeixen diferències en l'obtenció de metafases respecte els casos normals o amb altres alteracions cromosòmiques està per determinar. La utilització de nous mitògens com els oligonucleòtids CpG ha augmentat l'obtenció de metafases tumorals. Estudis comparatius de CC assenyalen que l'estimulació amb TPA és superior a l'estimulació amb oligonucleòtids CpG + IL-2 en quant a l'obtenció de metafases, resolució de bandes i detecció d'anomalies però, recomanen que s'utilitzin conjuntament tots tres mitògens i com a complement de la FISH (Wren *et al.* 2010).

La nostra experiència en els cultius de SP estimulats amb TPA és satisfactòria ja que és una metodologia fàcilment aplicable, s'obtenen metafases de la clona tumoral de qualitat acceptable i ens permet l'anàlisi de CC i de FISH en metafase i interfase amb una mateixa mostra.

4.2.5.2. Mida de la deleció 13q14 i la seva importància

Segons els resultats de l'estudi IV, la deleció més freqüent és la submicroscòpica intersticial (69%) seguida de la deleció gran (18%) identificable per bandes G que afecta a varies bandes cromosòmiques i la deleció submicroscòpica associada a translocació (13%). La dificultat per identificar les delecions i avaluar la mida d'aquestes en l'anàlisi de CC pot ser de vegades poc objectiu si els cromosomes són de baixa qualitat, a més de l'existència de delecions críptiques (Stockero *et al.* 2006). Com hem pogut comprovar, és de gran utilitat realitzar la met-FISH, ja que molts de cariotips amb cromosomes 13 aparentment normals han enmascarat delecions submicroscòpiques. En altres casos que el cromosoma 13 sembli delecionat i la FISH

sigui normal, s'haurien d'analitzar altres sondes per descartar si es tracta d'una deleció real d'altres locus o és degut a la qualitat dels cromosomes, ja que encara que nosaltres hem estudiat el locus *DLEU*, existeixen altres gens com el *RB* i altres locus propensos a la deleció (Struski et al. 2007). Si la mida de la deleció té importància en el pronòstic està per definir però alguns estudis indiquen que les delecions més extenses tenen pitjor pronòstic (Parker et al. 2011).

4.2.5.3. Nombre d'al·lels deleccionats i la seva importància

Les delecions monoal·lèliques són més freqüents que les bial·lèliques (78% vs. 22%). En altres publicacions, el 18-30% de les delecions són bial·lèliques, similar als nostres resultats (Haferlach et al. 2007; Garg et al. 2012; Puiggros et al. 2013). El pronòstic d'aquestes delecions és un tema controvertit. Els primers estudis indicaven que la deleció bial·lèlica presentava pitjor pronòstic (Dewald et al. 2003; Chena et al. 2008), però en estudis més recents sembla que no s'observen diferències (Dal Bo et al. 2011; Garg et al. 2012; Van Dyke et al. 2013). El darrer estudi de Puiggros et al. en col·laboració amb el *Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica* (GCECGH) i el *Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica* (GELLC) realitzat en 627 pacients, s'observa que els pacients amb deleció bial·lèlica no presenten pitjor pronòstic que els pacients amb deleció monoal·lèlica.

4.2.5.4. Relació entre la mida i nombre d'al·lels deleccionats i els mecanismes d'origen

Dins les delecions monoal·lèliques el 68% dels pacients presenten deleció submicroscòpica, el 23% gran i el 9% submicroscòpica associada a deleció. Dins els pacients amb deleció bial·lèlica en el 71% és submicroscòpica, el 29% és submicroscòpica associada a translocació i en cap cas la deleció és gran.

La freqüència de les diferents delecions en relació a la mida i al nombre d'al·lels deleccionats és similar en les submicroscòpiques que s'observen en proporcions

semblants entre les monoal·lèliques i les bial·lèliques, però hi ha diferències notables en les delecions grans que només són monoal·lèliques, i en les associades a translocació que són més freqüents dins de les bial·lèliques (9% vs. 29%). Això podria suggerir que aquestes delecions tenen diferents mecanismes d'origen. En el cas de les submicroscòpiques, grans i monoal·lèliques s'originarien per delecio simple. En el cas de les delecions bial·lèliques, la FISH detecta a més, una clona amb delecio monoal·lèlica i la clona normal. En alguns casos amb delecio associada a translocació, aquesta apareix com a subclona, ja que existeix a més una altra clona amb delecio però no associada a translocació. Aquestes dades suggereixen que les delecions bial·lèliques i les associades a translocació podrien originar-se degut a l'evolucio clonal o un estadi més avançat de la malaltia. En el nostre estudi, hi ha indicis de que s'associïn en més freqüència a altres alteracions en el cariotip però, seria necessari ampliar el nombre de casos per confirmar-ho. S'haurien de realitzar més estudis durant el seguiment d'aquests pacients per avaluar si aquestes delecions s'afegeixen degut a l'evolucio de la malaltia.

4.2.5.5. Delecions submicroscòpiques 13q14 associades a translocació

Hem observat que en el 13% dels pacients amb delecio 13q14 aquesta s'associa a translocació. Altres publicacions citen que les translocacions 13q14 s'observen entre el 7-16% se forma similar als nostres resultats (Mayr *et al.* 2006; Haferlach *et al.* 2007; Wren *et al.* 2010). Gardiner *et al.* van identificar mitjançant CC amb cultius estimulats TPA un 6,6% de casos amb translocació de 13q14 i en un 5% d'aquests amb delecio associada. La publicació menciona que degut a l'evolucio clonal, les translocacions es podrien originar com esdeveniment secundari de progressio donant lloc a una delecio bial·lèlica. No van observar diferències clíniques entre els casos translocats i els casos només delecionats, suggerint que la importància d'aquestes translocacions recau en la pèrdua del locus més que en la reorganització estructural o *partner* implicat (Gardiner *et al.* 1997). Les translocacions de 13q14 s'associen freqüentment a una delecio, per

tant, davant la identificació d'una translocació del cromosoma 13 seria recomanable descartar un delecíó 13q14 associada (Gardiner *et al.* 1997; Struski *et al.* 2007; Herholz *et al.* 2007). Però, el valor pronòstic de les translocacions en la LLC encara no és clar. Contràriament, estudis més recents indiquen una clara associació entre la presència de translocacions i pronòstic menys favorable, i en concret les translocacions no equilibrades (Mayr *et al.* 2006; Van Den Neste *et al.* 2007). Mayr *et al.* descriuen que pacients amb delecíó 13q14 associada a translocació presenten una SLT més curta que els pacients amb delecíó única. A més, descarten l'aparició de la translocació com a conseqüència del tractament, però si que es pensa que podria ser deguda a l'evolució clonal. En canvi, Van Den Neste *et al.* a més observen que les translocacions apareixen en més tendència en pacients que ja han rebut tractament, en casos de cariotip complex i amb delecíó de *P53*, i proposen la presència de translocacions com un nou subgrup pronòstic.

Translocacions implicant 13q14 associades a delecíó no descrites

A diferència d'altres leucèmies o limfomes d'origen B on les translocacions específiques desregulen oncogens, les translocacions equilibrades recurrents no són gaire freqüents en la LLC. En l'estudi IV l'aplicació conjunta de la I-FISH, met-FISH, i CC, en cultius de SP estimulats amb TPA, ha permès identificar delecions 13q14 associades a translocació amb múltiples *partners* ja descrits i 4 noves translocacions que no han estat descrites anteriorment: la $der(1)t(1;13)(q21;q14)inv(q42q21)$, la $t(1;5;13)(p36;q31;q14)$, la $t(9;13)(q31;q14-21)$ i la $t(10;13)(p14-15;q12)$. Les dues primeres són translocacions complexes que serien el resultat de translocacions seriades o, trencaments i errors de reparació simultanis en diferents cromosomes. Estudis de seqüència de l'ADN suggereixen que els reordenaments cromosòmics s'acompanyen freqüentment de delecions submicroscòpiques que succeeixen en regions riques en repeticions de seqüències Alu i LCR més susceptibles a la inestabilitat i per tant a translocar-se (Kolomietz *et al.* 2001; Fink *et al.* 2006). Seria

bo identificar els nous gens implicats i estudiar si, a banda de la pèrdua de material a 13q14, la disrupció d'aquests activa algun altre mecanisme leucèmic.

Importància de la caracterització de les delecions 13q14

Davant la identificació d'una delecio 13q14 mitjançant I-FISH, és recomanable l'anàlisi en metafase mitjançant met-FISH i bandes G per tal de confirmar la delecio principalment en els casos de valors propers a la positivitat, avaluar la mida d'aquesta i si és deguda a delecio intersticial o a una pèrdua de material associada a translocacio per futurs estudis pronòstics. I al contrari, davant un cariotip normal o una translocacio del cromosoma 13 seria recomanable realitzar la met-FISH per descartar una delecio submicroscòpica. En la FISH, a banda de la utilitzacio de la sonda del locus 13q14, és imprescindible la utilitzacio d'una altra sonda com la telomèrica que faci de control intern sobre tot en els casos amb delecio bial·lèlica i en l'associada a translocacio. En tot cas, es recomana recuperar l'anàlisi CC amb estimulants per tal d'identificar alteracions en aquells pacients amb FISH normal, ja que la tercera part d'aquests presenten alteracions al cariotip (Rigolin *et al.* 2012). Les tres metodologies s'haurien d'utilitzar conjuntament per solventar les limitacions de cadascuna d'elles.

4.3. NEOPLÀSIES DE CÈL·LULES PLASMÀTIQUES

4.3.1. Limitacions per l'anàlisi citogenètica convencional i importància de l'estudi de FISH interfase

Les dificultats en l'anàlisi citogenètic d'aquests pacients són degudes principalment a la baixa infiltració de CP d'algunes algunes mostres que fa que aquestes estiguin poc representades respecte altres cèl·lules que formen la MO. L'escassa proliferació de les CP en ser cultivades també limita l'estudi en metafase i si s'obtenen, aquestes sovint

són normals fruit de la divisió de cèl·lules de la línia mieloide o amb alteracions críptiques només detectables per FISH. Altres vegades, encara que les metafases siguin de CP tumorals existeix la dificultat en formar clones (Fonseca *et al.* 2004). L'aplicació de la FISH incrementa la detecció d'alteracions cromosòmiques i identifica algunes alteracions críptiques freqüents en les neoplàsies de CP. Combinada amb les diferents metodologies de separació o identificació cel·lular possibilita l'anàlisi exclusiu de la població de CP responsable de la malaltia, solventant gran part de les limitacions del l'anàlisi convencional, de tal manera que el IMWG recomana la I-FISH en CP separades o identificades mitjançant els mètodes de separació immunomagnètica, identificació immunofluorescent o tinció morfològica de CP, considerant-la com a *gold-standard* (Dimopoulos *et al.* 2011; Munshi *et al.* 2011).

4.3.1. Comparació de les tècniques de I-FISH en cultius de MO i en cèl·lules plasmàtiques aïllades per a la detecció d'alteracions cromosòmiques

Seguint les recomanacions del IMWG, en l'estudi V s'han separat les CP de MO de 221 pacients realitzant una separació immunomagnètica amb partícules MACS anti-CD138 i s'ha realitzat la I-FISH per detectar les delecions de 13q14 o monosomia 13. Segons els resultats de l'estudi V el 39% dels pacients presenten alteracions del cromosoma 13. Entre aquests pacients amb alteracions, s'han seleccionat aquells en els que a més, es va realitzar un cultiu de MO amb o sense estimulants per tal de realitzar la I-FISH i avaluar la detecció d'alteracions d'aquesta metodologia respecte la I-FISH-CP. En el 82% dels casos seleccionats, s'observa la monosomia 13 i en el 18% restant una delecio de 13q14 mitjançant I-FISH-CP. Cal remarcar que hem considerat la pèrdua de 13q14 + 13q34 com monosomia 13, però no podem assegurar que aquesta sigui una monosomia en l'estricta sentit, en tot cas s'hauria de considerar com una delecio que afecta a gran part del cromosoma. S'ha observat que el percentatge mitjà de nuclis patològics mitjançant I-FISH-MO és del 10% i en I-FISH-CP del 73%. La

I-FISH-MO únicament ha identificat el 26% dels casos seleccionats com patològics.

Valoració de la taxa de detecció de les alteracions cromosòmiques i dels cut-off

De forma silimilar als nostres resultats altres autors observen al voltant del 25-50% de casos amb alteracions del cromosoma 13 i fins al 92% de casos patològics estudiant més regions cromosòmiques (Konigsberg *et al.* 2000; Avet-Loiseau *et al.* 2002; Christensen *et al.* 2007). D'acord amb altres autors i contràriament al que succeeix en la LLC, cap dels casos presenta deleció bial·lèlica (Shaughnessy *et al.* 2000; Fonseca *et al.* 2001b; Christensen *et al.* 2007).

En l'estudi V el percentatge mitjà de nuclis patològics que s'observa mitjançant I-FISH-CP i I-FISH-MO és molt discrepant (73% vs. 10%). Si considerem que tots els pacients són seleccionats per tenir alteracions del cromosoma 13 i que el *cut-off* en CP s'ha situat en el 20%, els pacients tenen una proporció elevada de CP tumorals patològiques. En canvi, quan s'estudia mitjançant I-FISH-MO, la mitjana de nuclis patològics està lleugerament sota el seu *cut-off*, situat en 11%, indicant que per aquesta metodologia la majoria dels casos són normals i que en els patològics, el percentatge CP tumorals és baix, per aquest motiu només ha detectat el 26% dels casos patològics. El *cut-off* en CP aïllades s'ha determinat en part seguint el valor proposat per l'*European Myeloma Network* (no publicat) i que han seguit altres autors (Liebisch i Döhner 2006; Christensen *et al.* 2007; Put *et al.* 2010) però com el percentatge de nuclis patològics habitualment és força superior, aquest no seria un problema. El mateix valor de positivitat també va ser proposat per a les mostres de MO sense separació de CP però en el nostre cas, en la I-FISH-MO el *cut-off* s'ha aproximat als de la LLC, on tenim més experiència. En aquest cas, com el percentatge de nuclis patològics és força baix, utilitzar un altre *cut-off* influiria clarament en els resultats.

La superioritat de la selecció de CP respecte les cèl·lules cultivades ja es va suggerir en un petit estudi comparatiu de 13 pacients (Fiserova *et al.* 2002). Altres estudis

posteriors també es fa una comparació entre les metodologies però en un grup de pacients més ampli. Christensen *et al.* realitzen en 192 pacients una comparació de les metodologies entre dos grups independents i identifiquen les CP amb tinció immunofluorescent de la Ig citoplasmàtica. L'estudi detecta el 92% d'alteracions cromosòmiques mitjançant la identificació de CP i només el 46% d'alteracions sense la identificació (Christensen *et al.* 2007). La publicació de Put *et al.* realitza una comparació en paral·lel similar a la nostra. Aquest grup estudia 235 pacients i realitza la separació immunomagnètica de CP mitjançant dues metodologies diferents i a més de la identificació de CP amb la Ig citoplasmàtica. Enriquant la mostra detecten el 71% d'alteracions cromosòmiques i en cèl·lules en cultiu només el 35% d'alteracions. També relacionen el recompte de CP amb la detecció d'alteracions (Put *et al.* 2010). Les sondes utilitzades en els estudis són diferents, però ambdós conclouen que la I-FISH en CP és superior que en cultiu de MO.

4.3.2. Relació entre el recompte de cèl·lules plasmàtiques i la detecció d'alteracions mitjançant I-FISH en cultiu de MO

En tots els pacients de l'estudi V s'ha realitzat un recompte de CP previ mitjançant l'anàlisi citològic en extensió de MO tenyida amb MGG per tal de determinar el percentatge de CP present en cada mostra. La mitjana de CP en les mostres de MO analitzades és del 28%. Relacionant el recompte de CP amb el nombre de casos patològics mitjançant I-FISH-MO, s'observa que en el grup amb un recompte baix de CP (6-24% de CP) cap dels casos és detectat com patològic, en el grup intermedi (25-40% de CP) es detecta un 25% dels casos patològics i en el grup amb un recompte de CP elevat (41-95% de CP) només el 65% dels casos són detectats com patològics.

Valoració del recompte de limfòcits i la detecció d'alteracions mitjançant I-FISH en cultiu de MO

Quan relacionem el recompte de CP i el nombre de casos patològics mitjançant I-FISH-MO, els resultats indiquen que si el recompte de CP és baix la metodologia no és efectiva. Aquesta només detecta alteracions en mostres de MO que tinguin més del 25% de CP. Però tot i així, en mostres amb un recompte de CP alt, tampoc és suficientment efectiva ja que dins d'aquest grup, només detecta el 65% dels casos patològics.

Aquestes discrepàncies podrien ser degudes principalment a que quan la MO es cultiva, la resta de cèl·lules que formen la MO, bàsicament les de la línia mieloide, proliferen amb més facilitat que les CP i aquestes disminueixen en proporció i queden emmascarades. Però hi ha algunes mostres de MO amb una infiltració de CP molt elevada en les que pràcticament la totalitat està composta per CP i que la I-FISH-MO tampoc detecta, essent més difícil de justificar. La distribució de les CP en la MO pot ser molt heterogènia i de vegades l'extensió citològica que es realitza pot ser poc uniforme observant-se unes zones amb una elevada densitat de CP i altres zones sense CP i per tant, el recompte de CP pot ser variable. De la mateixa manera, l'extensió citològica tampoc hauria de correspondre necessàriament amb la composició real de la mostra de MO i de vegades la mostra que es destina per l'estudi citogenètic no és la primera fracció que s'extreu i pot estar diluïda (Put et al. 2010). En alguns d'aquests casos aquest fet podria donar explicació a les discrepàncies però, és un punt que encara estaria per aclarir. Tampoc hem analitzat si influeix d'alguna manera el cultiu de MO en la viabilitat de les CP.

Importància de la I-FISH en cèl·lules plasmàtiques

Segons els nostres resultats la separació de CP mitjançant partícules immunomagnètiques MACS contribueix incrementant la detecció d'alteracions cromosòmiques sense que aquestes quedin ocultes entre els altres tipus cel·lulars. En

un altre estudi que vam realitzar, però que no s'ha presentat, s'observa que amb aquesta tècnica al voltant del 98% de les cèl·lules recuperades són CP, per tant, sabem del cert que les cèl·lules que analitzem en la I-FISH són CP. Altres publicacions també indiquen que la puresa de la mostra un cop realitzada la separació immunomagnètica de CP mitjançant MACS és >95% (Avet-Loiseau *et al.* 1999b; Avet-Loiseau *et al.* 2002). Aquesta metodologia encara que és fàcil de realitzar, requereix més recursos materials i més personal que no faciliten tant la seva aplicació en la rutina diària del laboratori. Per altre banda, no requereix tanta experiència com en el cas de la identificació morfològica de CP T-FISH o MGG-FISH ni s'observa hibridació inespecífica com pot succeir en la identificació de CP amb tinció immunofluorescent de la Ig citoplasmàtica o FICTION. En la nostra experiència, és important que el marcatge immunomagnètic i la separació es realitzi en la mostra fresca, ja que les CP habitualment perden alguns dels seus marcadors específics o entren en apoptosi amb el pas del temps (Christensen *et al.* 2007). A més, la quantitat de cèl·lules que obtenim després de realitzar la separació és molt escassa i és dependent del percentatge de CP i del volum de mostra que disposem. Per tant, és molt important prioritzar en l'elecció de les sondes d'ADN per a la detecció de les alteracions. La valoració dels senyals de hibridació de vegades és una feina laboriosa, ja que si la preparació és poc cel·lular requerirà un temps important valorar 200 nuclis interfàsics, però potser, els temps és inferior que mitjançant les tècniques de FICTION o T-FISH en que les preparacions presenten tots els tipus cel·lulars. El mètode d'enriquiment cel·lular més adequat dependrà de les característiques de cada laboratori (Hartmann *et al.* 2011) Tot i així, considerem que és necessari realitzar aquest esforç per implementar-la.

5. CONCLUSIONS

5.1. LLA-B

- S'han identificat mitjançant l'anàlisi CC i FISH dues translocacions amb implicació del gen *IGH*: la t(2;14)(q14.3;q32) i la t(14;17)(q32;q21), no descrites fins el moment.

5.2. LLC

- La I-FISH en cultius de SP estimulats amb TPA incrementa el nombre de nuclis patològics i la detecció alteracions cromosòmiques comparat amb la I-FISH en cèl·lules mononucleades separades per gradient de densitat.
- S'ha observat que en els pacients amb una limfocitosi absoluta $<8,7 \times 10^9/L$ és recomanable realitzar la I-FISH en cultius de SP estimulats amb TPA en lloc de la I-FISH en cèl·lules mononucleades separades per gradient de densitat.
- La I-FISH en cultius de SP estimulats amb TPA proporciona una millor predicció de la supervivència lliure de tractament i la supervivència global que la I-FISH en cèl·lules mononucleades separades per gradient de densitat.
- La I-FISH en cultius de SP estimulats amb TPA incrementa la detecció de la deleció 13q14 i millora el valor pronòstic en aquests pacients.
- La I-FISH-TPA és una metodologia fiable com a factor pronòstic particularment en els casos amb un recompte de limfòcits baix.
- S'ha observat que el 78% de les delecions 13q14 són monoal·lèliques i el 22% bial·lèliques.
- El 69% de les delecions 13q14 són submicroscòpiques, el 18% grans i el 13% submicroscòpiques associades a translocació.
- Les delecions 13q14 grans són únicament monoal·lèliques.
- Les delecions 13q14 associades a translocació són més freqüents entre les delecions bial·lèliques i semblen degudes a l'evolució clonal.

- S'han identificat quatre translocacions 13q14 amb deleció associada no descrites fins el moment. Aquestes són la der(1)t(1;13)(q21;q14)inv(q42q21), la t(1;5;13)(p36;q31;q14), la t(9;13)(q31;q14-21) i la t(10;13)(p14-15;q12).

5.3. NEOPLÀSIES DE CÈL·LULES PLASMÀTIQUES

- Mitjançant I-FISH en cèl·lules plasmàtiques s'ha observat que el 39% dels pacients presenten alteracions del cromosoma 13.
- El 18% dels casos presenten deleció 13q14 i el 82% deleció 13q14+13q34.
- El percentatge de nuclis patològics observat mitjançant I-FISH en cèl·lules plasmàtiques és superior a l'observat mitjançant I-FISH en cultiu de MO.
- La I-FISH en cultiu de MO únicament ha identificat el 26% dels casos patològics.
- La I-FISH en cultiu de MO no és efectiva en el casos amb un recompte de cèl·lules plasmàtiques <25%. Aquesta és una metodologia poc efectiva per a l'estudi citogenètic encara que la infiltració de CP en MO sigui elevada.
- S'ha demostrat que la I-FISH en CP separades mitjançant partícules immunomagnètiques MACS és la metodologia d'elecció per a la detecció de les alteracions cromosòmiques, particularment en aquells casos amb poca infiltració de CP en MO.

6. REFERÈNCIES

Akasaka T, Balasas T, Russell LJ, Sugimoto KJ, Majid A, Walewska R, Karran EL, Brown DG, Cain K, Harder L, Gesk S, Martin-Subero JI, Atherton MG, Bruggemann M, Calasanz MJ, Davies T, Haas OA, Hagemeijer A, Kempinski H, Lessard M, Lillington DM, Moore S, Nguyen-Khac F, Radford-Weiss I, Schoch C, Struski S, Talley P, Welham MJ, Worley H, Strefford JC, Harrison CJ, Siebert R, Dyer MJ. *Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL)*. Blood. 2007;109(8):3451-3461.

Aoun P, Blair HE, Smith LM, Dave BJ, Lynch J, Weisenburger DD, Pavletic SZ, Sanger WG. *Fluorescence in situ hybridization detection of cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma*. Leuk Lymphoma. 2004;45(8):1595-603.

Austen B, Powell JE, Alvi A, Edwards I, Hooper L, Starczynski J, Taylor AM, Fegan C, Moss P, Stankovic T. *Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL*. Blood. 2005;106(9):3175-82.

Avet-Loiseau H, Brigaudeau C, Morineau N, Talmant P, Lai JL, Daviet A, Li JY, Praloran V, Rapp MJ, Harousseau JL, Facon T, Bataille R. *High incidence of cryptic translocations involving the Ig heavy chain gene in multiple myeloma, as shown by fluorescence in situ hybridization*. Genes Chromosomes Cancer. 1999a;24(1):9-15.

Avet-Loiseau H, Li JY, Godon C, Morineau N, Daviet A, Harousseau JL, Facon T, Bataille R. *P53 deletion is not a frequent event in multiple myeloma*. Br J Haematol. 1999b;106(3):717-9.

Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N, Facon T, Brigaudeau C, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R. *Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma*. Intergroupe Francophone du Myelome. Blood. 1999c;94(8):2583-9.

Avet-Louseau H, Daviet A, Sauner S, Bataille R, Intergroupe Francophone du Myelome. *Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13*. Br J Haematol. 2000;111(4):1116-7.

Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, Minvielle S, Bataille R, Intergroupe Francophone du Myelome. *Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation*. Blood. 2002;99(6):2185-91.

Avet-Loiseau H. *Role of genetics in prognostication in myeloma*. Best Pract Res Clin Haematol. 2007;20(4):625-35.

Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, Leyvraz S, Michallet M, Yakoub-Agha I, Garderet L, Marit G, Michaux L, Voillat L, Renaud M, Grosbois B, Guillerme G, Benboubker L, Monconduit M, Thieblemont C, Casassus P, Caillot D, Stoppa AM, Sotto JJ, Wetterwald M, Dumontet C, Fuzibet JG, Azais I, Dorvaux V, Zandecki M, Bataille R, Minvielle S, Harousseau JL, Facon T, Mathiot C. *Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome*. Blood. 2007;109(8):3489-95.

Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M, Moreau P, Guerin-Charbonnel C, Caillot D, Marit G, Benboubker L, Voillat L, Mathiot C, Kolb B, Macro M, Champion L, Wetterwald M, Stoppa AM, Hulin C, Facon T, Attal M, Minvielle S, Harousseau JL. *Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p)*. J Clin Oncol. 2010;28(30):4630-4.

Bartel DP. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell. 2004;116(2):281-97. Review.

Bell JL, Wächter K, Mühleck B, Pazaitis N, Köhn M, Lederer M, Hüttelmaier S. *Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression?* Cell Mol Life Sci. 2013;70(15):2657-75.

Bellido M, Aventin A, Lasa A, Estivill C, Carnicer MJ, Pons C, Matias-Guiu X, Bordes R, Baiget M, Sierra J, Nomdedeu JF. *Id4 is deregulated by a t(6;14)(p22;q32) chromosomal translocation in a B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia*. Haematologica. 2003;88(9):994-1001.

Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. *Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)*. Leukemia. 1995;9(10):1783-6.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol. 1976;33(4):451-8.

Bentz M, Huck K, du Manoir S, Joos S, Werner CA, Fischer K, Dohner H, Lichter P. *Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses*. Blood. 1995;85(12):3610-8.

Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. *Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma*. Blood. 2005;106(1):296-303.

Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbès S, Gremy F. *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. Cancer. 1981;48(1):198-206.

Blade J, Cibeira MT, Fernandez de Larrea C, Rosiñol L. *Multiple myeloma*. Ann Oncol. 2010;21 Suppl 7:vii313-9.

Boyum A. *Separation of leukocytes from blood and bone marrow*. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968;97:7.

Broadfield ZJ, Hain RD, Harrison CJ, Reza Jalali G, McKinley M, Michalova K, Robinson HM, Zemanova Z, Martineau M. *Complex chromosomal abnormalities in utero, 5 years before leukaemia*. Br J Haematol. 2004;126(3):307-12.

Buhmann R, Kurzeder C, Rehkla J, Westhaus D, Bursch S, Hiddemann W, Haferlach T, Hallek M, Schoch C. *CD40L stimulation enhances the ability of conventional metaphase cytogenetics to detect chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells*. Br J Haematol. 2002;118(4):968-75.

Bullrich F, Fujii H, Calin G, Mabuchi H, Negrini M, Pekarsky Y, Rassenti L, Alder H, Reed JC, Keating MJ, Kipps TJ, Croce CM. *Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene*. Cancer Res. 2001;61(18):6640-8.

Byrd JC, Smith L, Hackbarth ML, Flinn IW, Young D, Proffitt JH, Heerema NA. *Interphase cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia may predict response to rituximab*. Cancer Res. 2003;63(1):36-8.

Calasanz MJ, Cigudosa JC, Odero MD, Ferreira C, Ardanaz MT, Fraile A, Carrasco JL, Sole F, Cuesta B, Gullon A. *Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations*. Genes Chromosomes Cancer. 1997;18(2):84-93.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Alder H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(24):15524-9.

Callen DF and Ford JH. *Chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukemia revealed by TPA as a mitogen*. Cancer Genet Cytogenet. 1983;10(1):87-93.

Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L. *Chemical differentiation along metaphase chromosomes*. Exp Cell Res. 1968;49(1):219-22.

Catovsky D, Richards S, Matutes E, Burford A, Brito-Babapulle V, Dearden C, Morris P, Pettitt A. *Response to Therapy and Survival in CLL Is Influenced by Genetic Markers. Preliminary Analysis from the LRF CLL4 Trial*. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2004;104:13.

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;370(9583):230-9.

Chang H, Li D, Zhuang L, Nie E, Bouman D, Stewart AK, Chun K. *Detection of chromosome 13q deletions and IgH translocations in patients with multiple myeloma by FISH: comparison with karyotype analysis*. Leuk Lymphoma. 2004a;45(5):965-9.

Chang H, Wechalekar A, Li L, Reece D. *Molecular cytogenetic abnormalities in patients with concurrent chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma shown by interphase fluorescence in situ hybridization: evidence of distinct clonal origin*. Cancer Genet Cytogenet. 2004b;148(1):44-8.

Chang H, Qi C, Yi QL, Reece D, Stewart AK. *P53 Gene Deletion Detected by Fluorescence in Situ Hybridization is an Adverse Prognostic Factor for Patients with Multiple Myeloma Following Autologous Stem Cell Transplantation*. Blood. 2005a;105(1):358-60.

Chang H, Sloan S, Li D, Patterson B. *Genomic aberrations in plasma cell leukemia shown by interphase fluorescence in situ hybridization*. Cancer Genet Cytogenet. 2005b;156(2):150-3.

Chang H, Qi X, Jiang A, Xu W, Young T, Reece D. *1p21 Deletions are Strongly Associated with 1q21 Gains and are an Independent Adverse Prognostic Factor for the Outcome of High-Dose Chemotherapy in Patients with Multiple Myeloma*. Bone Marrow Transplant. 2010;45(1):117-21.

Chapiro E, Russell LJ, Struski S, Cave H, Radford-Weiss I, Valle VD, Lachenaud J, Brousset P, Bernard OA, Harrison CJ, Nguyen-Khac F. *A new recurrent translocation t(11;14)(q24;q32) involving IGH@ and miR-125b-1 in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia. 2010;24(7):1362-4.

Chapiro E, Radford-Weiss I, Cung HA, Dastugue N, Nadal N, Taviaux S, Barin C, Struski S, Talmant P, Vandenberghe P, Mozziconacci MJ, Tigaud I, Lefebvre C, Penther D, Bastard C, Lippert E, Mugneret F, Romana S, Bernard OA, Harrison CJ, Russell LJ, Nguyen-Khac F; Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. *Chromosomal translocations involving the IGH@ locus in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: 29 new cases and a review of the literature*. Cancer Genet. 2013;206(5):162-73.

Chen Z, Issa B, Huang S, Aston E, Xu J, Yu M, Brothman AR, Glenn M. *A practical approach to the detection of prognostically significant genomic aberrations in multiple myeloma*. J Mol Diagn. 2005;7(5):560-5.

Chena C, Sarmiento M, Palacios MF, Scolnik M, Slavutsky I. *Dup(12)(q13-q22) and 13q14 deletion in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Acta Haematol. 2000;104(4):197-201.

Chena C, Cerretini R, Noriega MF, Narbaitz M, Scolnik M, Palacios MF, Neme D, Bruno S, Slavutsky I. *Cytogenetic, FISH, and molecular studies in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia with karyotypic evolution*. Eur J Haematol. 2002;69(5-6):309-14.

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;146(2):154-60.

Chena C, Avalos JS, Bezares RF, Arrossagaray G, Turdo K, Bistmans A, Slavutsky I. *Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies*. *Eur J Haematol*. 2008;81(2):94-9.

Chen-Kiang S. *Biology of plasma cells*. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(4):493-507.

Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO, Martelli ML, Brents LA, Chen T, Schrock E, Ried T, Kuehl WM. *Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma*. *Blood*. 1998a;91(12):4457-63.

Chesi M, Nardini E, Lim RS, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL. *The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts*. *Blood*. 1998b;92(9):3025-34.

Chiecchio L, Protheroe RK, Ibrahim AH, Cheung KL, Rudduck C, Dagrada GP, Cabanas ED, Parker T, Nightingale M, Wechalekar A, Orchard KH, Harrison CJ, Cross NC, Morgan GJ, Ross FM. *Deletion of chromosome 13 detected by conventional cytogenetics is a critical prognostic factor in myeloma*. *Leukemia*. 2006;20(9):1610-7.

Chiecchio L, Dagrada GP, Ibrahim AH, Dachs Cabanas E, Protheroe RK, Stockley DM, Orchard KH, Cross NC, Harrison CJ, Ross FM, UK Myeloma Forum. *Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context*. *Haematologica*. 2009;94(12):1708-13.

Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. *Chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*. 2005;352(8):804-15.

Christensen JH, Abildgaard N, Plesner T, Nibe A, Nielsen O, Sørensen AG, Kerndrup GB; Leukemia/Lymphoma Study Group, Region of Southern Denmark. *Interphase fluorescence in situ hybridization in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance without and with positive plasma cell identification: analysis of 192 cases from the Region of Southern Denmark*. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;174(2):89-99.

Corcoran MM, Rasool O, Liu Y, Iyengar A, Grander D, Ibbotson RE, Merup M, Wu X, Brodysky V, Gardiner AC, Juliusson G, Chapman RM, Ivanova G, Tiller M, Gahrton G, Yankovsky N, Zabarovsky E, Oscier DG, Einhorn S. *Detailed molecular delineation of 13q14.3 loss in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*. 1998;91(4):1382-90.

Craig FE. *Flow cytometric evaluation of B-cell lymphoid neoplasms*. *Clin Lab Med*. 2007;27(3):487-512.

Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L. *Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes*. *Hum Genet*. 1988;80(3):235-46.

Crowther-Swanepoel D, Corre T, Lloyd A, Gaidano G, Olver B, Bennett FL, Doughty C, Toniolo D, Caligaris-Cappio F, Ghia P, Rossi D, Rawstron AC, Catovsky D, Houlston RS. *Inherited genetic susceptibility to monoclonal B-cell lymphocytosis*. *Blood*. 2010;116(26):5957-60.

Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, Deambrogi C, Bertoni F, Del Giudice I, Palumbo G, Nanni M, Rinaldi A, Kwee I, Tissino E, Corradini G, Gozzetti A, Cencini E, Ladetto M, Coletta AM, Luciano F, Bulian P, Pozzato G, Laurenti L, Forconi F, Di Raimondo F, Marasca R, Del Poeta G, Gaidano G, Foa R, Guarini A, Gattei V. *13q14 Deletion Size and Number of Deleted Cells both Influence Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50(8):633-43.

- De Tute R, Yuille M, Catovsky D, Houlston RS, Hillmen P, Rawstron AC. *Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) in CLL families: substantial increase in relative risk for young adults*. *Leukemia*. 2006;20(4):728-9.
- Delgado J, Espinet B, Oliveira AC, Abrisqueta P, de la Serna J, Collado R, Loscertales J, Lopez M, Hernandez-Rivas JA, Ferra C, Ramirez A, Roncero JM, Lopez C, Aventin A, Puiggros A, Abella E, Carbonell F, Costa D, Carrio A, Gonzalez M, on behalf of the Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC) y Grupo Español de Citogenética Hematológica (GECGH). *Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results*. *Br J Haematol*. 2012;157(1):67-74.
- Delves PJ and Roitt IM. 2006. *Roitt's essential immunology*. 11th ed. Blackwell. Oxford.
- Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, Greipp PR. *The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis*. *Blood*. 1985;66(2):380-90.
- Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C, James CD, Jelinek DF, Tschumper RC, Hanson CA, Pruthi RK, Witzig TE, Call TG, Kay NE. *Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. *Br J Haematol*. 2003;121(2):287-95.
- Dewald GW, Therneau T, Larson D, Lee YK, Fink S, Smoley S, Paternoster S, Adeyinka A, Ketterling R, Van Dyke DL, Fonseca R, Kyle R. *Relationship of patient survival and chromosome anomalies detected in metaphase and/or interphase cells at diagnosis of myeloma*. *Blood*. 2005;106(10):3553-8.
- Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. *Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression*. *Blood*. 2006;108(9):3152-60.
- Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L, La Starza R, Zeller W, Mecucci C, Van den Berghe H. *Successful use of the same slide for consecutive fluorescence in situ hybridization experiments*. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996;16(4):261-4.
- Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, Rajkumar SV, San Miguel J, Chanan-Khan A, Ludwig H, Joshua D, Mehta J, Gertz M, Avet-Loiseau H, Beksac M, Anderson KC, Moreau P, Singhal S, Goldschmidt H, Boccadoro M, Kumar S, Giral S, Munshi NC, Jagannath S, International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3*. *Blood*. 2011;117(18):4701-5.
- Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S. *p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias*. *Blood*. 1995;85(6):1580-9.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P. *Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis*. *J Mol Med*. 1999;77(2):266-81. Review.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6.
- Duncan LM, Dietzsch E, Rudduck C, Garson OM. *A simple G-banding technique following nonradioactive in situ hybridization*. *Cytogenet Cell Genet*. 1993;62(4):228-30.

Durie BG and Salmon SE. *A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival.* Cancer. 1975;36(3):842-54.

Duro D, Bernard O, Della Valle V, Leblanc T, Berger R, Larsen CJ. *Inactivation of the P16INK4/MTS1 gene by a chromosome translocation t(9;14)(p21-22;q11) in an acute lymphoblastic leukemia of B-cell type.* Cancer Res. 1996;56(4):848-54.

Dyer MJ, Akasaka T, Capasso M, Dusanjh P, Lee YF, Karran EL, Nagel I, Vater I, Cario G, Siebert R. *Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers?* Blood. 2010;115(8):1490-9.

Eclache V, Caulet-Maugendre S, Poirel HA, Djemai M, Robert J, Lejeune F, Raphael M. *Cryptic deletion involving the ATM locus at 11q22.3 approximately q23.1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders.* Cancer Genet Cytogenet. 2004;152(1):72-6.

El-Taweel M, Barin C, Cymbalista F, Eclache V. *Detection of chromosomal abnormalities associated with chronic lymphocytic leukemia: what is the best method?* Cancer Genet Cytogenet. 2009;195(1):37-42.

Espinete B, Sole F, Lloveras E, Abella E, Besses C, Woessner S, Florensa L. *Dicentric (17;18) in a case of atypical B-cell chronic lymphocytic leukemia.* Cancer Genet Cytogenet. 2000;121(2):194-7.

Esteller M. 2011. *Epigenética e hipermetilación.* Editores Médicos, S.A. EDIMSA. España.

Fink SR, Smoley SA, Stockero KJ, Paternoster SF, Thorland EC, Van Dyke DL, Shanafelt TD, Zent CS, Call TG, Kay NE, Dewald GW. *Loss of TP53 is due to rearrangements involving chromosome region 17p10 approximately p12 in chronic lymphocytic leukemia.* Cancer Genet Cytogenet. 2006;167(2):177-81.

Fiserová A, Hájek R, Holubová V, Büchler T, Sobotka J, Kovárová R, Musilová R, Bourková L, Buliková A, Mareschová I, Janáčková Z, Váňová P, Kuglík P, Vorlíček J, Penka M. *Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells.* Neoplasma. 2002;49(5):300-6.

Fonseca R, Oken MM, Greipp PR, Eastern Cooperative Oncology Group Myeloma Group. *The t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance.* Blood. 2001a;98(4):1271-2.

Fonseca R, Oken MM, Harrington D, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR, Dewald GW. *Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy.* Leukemia. 2001b;15(6):981-6.

Fonseca R, Blood EA, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Hoyer JD, Harrington D, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR. *Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients.* Blood. 2002a;99(10):3735-41.

Fonseca R, Harrington D, Oken MM, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Blood EA, Rajkumar SV, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR. *Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (delta13) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study.* Cancer Res. 2002b;62(3):715-20.

Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, Dewald GW, Bryant SC, Winkler JM, Blood E, Oken MM, Santana-Davila R, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Greipp

PR. *The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma.* Blood. 2003;102(7):2562-7.

Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD, Jr, Stewart AK, Avet-Loiseau H. *Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report.* Cancer Res. 2004;64(4):1546-58.

Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S, Neri A, Barlogie B, Kuehl WM, Liebisch P, Davies F, Chen-Kiang S, Durie BG, Carrasco R, Sezer O, Reiman T, Pilarski L, Avet-Loiseau H, International Myeloma Working Group. *International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review.* Leukemia. 2009;23(12):2210-21.

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

Garg R, Wierda W, Ferrajoli A, Abruzzo L, Pierce S, Lerner S, Keating M, O'Brien S. *The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia.* Cancer. 2012;118(14):3531-7.

Ghia P, Prato G, Scielzo C, Stella S, Geuna M, Guida G, Caligaris-Cappio F. *Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly.* Blood. 2004;103(6):2337-42.

Glassman AB and Hayes KJ. *The value of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and prognosis of chronic lymphocytic leukemia.* Cancer Genet Cytogenet. 2005;158(1):88-91.

Gomez-Segui I, Cervera J, Such E, Martinez-Cuadron D, Luna I, Ibanez M, Lopez-Pavia M, Gascon A, Roig M, Martinez J, Sanz J, Montesinos P, Martin-Aragones G, Lorenzo I, Senent L, Barragan E, Cordon L, Sempere A, Sanz GF, Sanz MA. *Prognostic value of cytogenetics in adult patients with Philadelphia-negative acute lymphoblastic leukemia.* Ann Hematol. 2012;91(1):19-25.

Gonzalez D, van der Burg M, Garcia-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, Gonzalez M, van Dongen JJ, San Miguel JF, Morgan GJ. *Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma.* Blood. 2007;110(9):3112-21.

Gozzetti A and Le Beau MM. *Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations.* Semin Hematol. 2000;37(4):320-33.

Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. *Leukemia in twins: lessons in natural history.* Blood 2003;102(7):2321-33.

Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. *International staging system for multiple myeloma.* J Clin Oncol. 2005;23(15):3412-20.

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

Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ, International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines.* Blood 2008;111(12):5446-56.

Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von Grunhagen U, Bergmann M, Catalano J, Zinzani PL, Caligaris-Cappio F, Seymour JF, Berrebi A, Jager U, Cazin B, Trneny M, Westermann A, Wendtner CM, Eichhorst BF, Staib P, Buhler A, Winkler D, Zenz T, Bottcher S, Ritgen M, Mendila M, Kneba M, Dohner H, Stilgenbauer S, 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):1164-74.

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*. 1999;94(6):1848-54.

Hanahan D and Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*. 2011;144(5):646-74. Review.

Hanamura I, Iida S, Akano Y, Hayami Y, Kato M, Miura K, Harada S, Banno S, Wakita A, Kiyoi H, Naoe T, Shimizu S, Sonta SI, Nitta M, Taniwaki M, Ueda R. *Ectopic expression of MAFB gene in human myeloma cells carrying (14;20)(q32;q11) chromosomal translocations*. *Jpn J Cancer Res*. 2001;92(6):638-44.

Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, Zhan F, Santra M, Sawyer JR, Hollmig K, Zangarri M, Pineda-Roman M, van Rhee F, Cavallo F, Burington B, Crowley J, Tricot G, Barlogie B, Shaughnessy JD, Jr. *Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation*. *Blood*. 2006;108(5):1724-32.

Harousseau JL, Shaughnessy J, Jr, Richardson P. *Multiple myeloma*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:237-56.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. *World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997*. *J Clin Oncol*. 1999;17(12):3835-49.

Harrison CJ, Mazzullo H, Cheung KL, Gerrard G, Jalali GR, Mehta A, Oscier DG, Orchard KH. *Cytogenetics of multiple myeloma: interpretation of fluorescence in situ hybridization results*. *Br J Haematol*. 2003;120(6):944-52.

Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Reza Jalali G, Robinson HM, Barber KE, Richards SM, Mitchell CD, Eden TO, Hann IM, Hill FG, Kinsey SE, Gibson BE, Lilleyman J, Vora A, Goldstone AH, Franklin IM, Durrant J, Martineau M, Childhood and Adult Leukaemia Working Parties. *Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia*. *Br J Haematol*. 2004;125(5):552-9.

Harrison CJ, Moorman AV, Barber KE, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Jalali GR, Robinson HM, Strefford JC, Stewart A, Wright S, Griffiths M, Ross FM, Harewood L, Martineau M. *Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study*. *Br J Haematol*. 2005;129(4):520-30.

Harrison CJ. *Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia*. *Br J Haematol*. 2009;144(2):147-56.

Harrison CJ, Haas O, Harbott J, Biondi A, Stanulla M, Trka J, Izraeli S, Biology and Diagnosis Committee of International Berlin-Frankfurt-Munster study group. *Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Munster study group*. *Br J Haematol*. 2010;151(2):132-42.

- Harrison CJ. *Acute lymphoblastic leukemia*. Clin Lab Med. 2011;31(4):631-47.
- Hartmann L, Biggerstaff JS, Chapman DB, Scott JM, Johnson KR, Ghirardelli KM, Fritschle WK, Martinez DL, Bennington RK, de Baca ME, Wells DA, Loken MR, Zehentner BK. *Detection of genomic abnormalities in multiple myeloma: the application of FISH analysis in combination with various plasma cell enrichment techniques*. Am J Clin Pathol. 2011;136(5):712-20.
- Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, Biegel J, Camitta BM, Cooley LD, Gaynon PS, Hirsch B, Magenis RE, McGavran L, Patil S, Pettenati MJ, Pullen J, Rao K, Roulston D, Schneider NR, Shuster JJ, Sanger W, Sutcliffe MJ, van Tuinen P, Watson MS, Carroll AJ. *Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. Genes Chromosomes Cancer. 2007;46(7):684-93.
- Heerema NA, Byrd JC, Dal Cin PS, Dell'Aquila ML, Koduru PRK, Aviram A, Smoley SA, Rassenti LZ, Greaves AW, Brown JR, Rai KR, Kipps TJ, Kay NE, Van Dyke DL. *Stimulation of chronic lymphocytic leukemia cells with CpG oligodeoxynucleotide gives consistent karyotypic results among laboratories: A CLL Research Consortium (CRC) Study*. Cancer Genet Cytogenet. 2010;203(2):134-40.
- Herholz H, Kern W, Schnittger S, Haferlach T, Dicker F, Haferlach C. *Translocations as a mechanism for homozygous deletion of 13q14 and loss of the ATM gene in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Genet Cytogenet. 2007;174(1):57-60.
- Hernandez JA, Rodriguez AE, Gonzalez M, Benito R, Fontanillo C, Sandoval V, Romero M, Martin-Nunez G, de Coca AG, Fisac R, Galende J, Recio I, Ortuno F, Garcia JL, de las Rivas J, Gutierrez NC, San Miguel JF, Hernandez JM. *A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia*. Haematologica. 2009;94(3):364-71.
- Hernandez JA, Sebastian V, Rodriguez A, Muñoz C, Delgado J, Collado R.. *Un porcentaje alto de pérdidas en el cromosoma 11q se asocia a una peor supervivencia en los pacientes con leucemia linfática crónica. Resultados preliminares del análisis de la base de datos de LLC/LBM del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECH) y del Grupo Español de LLC (GELLC)*. Haematologica (ed. esp.). 2011;96(2):14.
- Higgins MJ and Fonseca R. *Genetics of multiple myeloma*. Best Pract Res Clin Haematol. 2005;18(4):525-36.
- Hjalmar V, Kimby E, Matutes E, Sundstrom C, Wallvik J, Hast R. *Atypical lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukemia and trisomy 12 studied by conventional staining combined with fluorescence in situ hybridization*. Leuk Lymphoma. 2000;37(5-6):571-6.
- Hjalmar V, Hast R, Kimby E. *Sequential fluorescence in situ hybridization analyses for trisomy 12 in chronic leukemic B-cell disorders*. Haematologica. 2001;86(2):174-80.
- Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD, Green AR. 2010. *Postgraduate haematology*. 6th ed. Wiley-Blackwell. Malden, Mass.
- Jamet D, Marzin Y, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Banzakour S, Bourquard P, Morice P, Abgrall JF, Berthou C, De Braekeleer M. *Jumping translocations in multiple myeloma*. Cancer Genet Cytogenet. 2005;161(2):159-63.
- Janssen JW, Vaandrager JW, Heuser T, Jauch A, Kluin PM, Geelen E, Bergsagel PL, Kuehl WM, Drexler HG, Otsuki T, Bartram CR, Schuurin E. *Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32)*. Blood. 2000;95(8):2691-8.
- Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S, Elonen E, Gahrton G. *Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities*. N Engl J Med. 1990;323(11):720-4.

Kaleem Z, Shuster JJ, Carroll AJ, Borowitz MJ, Pullen DJ, Camitta BM, Zutter MM, Watson MS. *Acute lymphoblastic leukemia with an unusual t(8;14)(q11.2;q32): a Pediatric Oncology Group Study*. *Leukemia*. 2000;14(2):238-40. Review.

Karhu R, Tobin G, Thunberg U, Vilpo L, Sundstrom C, Knuutila S, Rosenquist R, Vilpo J. *More extensive genetic alterations in unmutated than in hypermutated cases of chronic lymphocytic leukemia*. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;37(4):417-20.

Kawamata N, Sakajiri S, Sugimoto KJ, Isobe Y, Kobayashi H, Oshimi K. *A novel chromosomal translocation t(1;14)(q25;q32) in pre-B acute lymphoblastic leukemia involves the LIM homeodomain protein gene, Lhx4*. *Oncogene*. 2002;21(32):4983-91.

Kearney L. *Molecular cytogenetics*. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001;14(3):645-69.

Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, Taylor BJ, Larratt LM, Mant MJ, Belch AR, Pilarski LM. *In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression*. *Blood*. 2003;101(4):1520-9.

Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, Karaskova J, Minkin S, Lipton J, Squire JA. *Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis*. *Blood*. 2001;97(11):3581-8.

Konigsberg R, Zojer N, Ackermann J, Kromer E, Kittler H, Fritz E, Kaufmann H, Nosslinger T, Riedl L, Gisslinger H, Jager U, Simonitsch I, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. *Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma*. *J Clin Oncol*. 2000;18(4):804-12.

Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S. *V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*. 2002;100(4):1410-6.

Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Hayman SR, Buadi FK, Dingli D, Knudson RA, Greenberg A, Russell SJ, Zeldenrust SR, Lust JA, Kyle RA, Bergsagel L, Rajkumar SV. *Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics*. *Blood*. 2012;119(9):2100-5.

Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, Kroger N, Einsele H, Vesole DH, Dimopoulos M, San Miguel J, Avet-Loiseau H, Hajek R, Chen WM, Anderson KC, Ludwig H, Sonneveld P, Pavlovsky S, Palumbo A, Richardson PG, Barlogie B, Greipp P, Vescio R, Turesson I, Westin J, Boccadoro M, International Myeloma Working Group. *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management*. *Leukemia*. 2010;24(6):1121-7.

Landgren O and Weiss BM. *Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis*. *Leukemia*. 2009;23(10):1691-7.

Landgren O, Kyle RA, Hoppin JA, Beane Freeman LE, Cerhan JR, Katzmann JA, Rajkumar SV, Alavanja MC. *Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the Agricultural Health Study*. *Blood*. 2009a;113(25):6386-91.

Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, Rajkumar SV. *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study*. *Blood*. 2009b;113(22):5412-7.

Liebisch P and Dohner H. *Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma*. *Eur J Cancer*. 2006;42(11):1520-9.

- Liu S, Bo L, Liu X, Li C, Qin S, Wang J. *IGH gene involvement in two cases of acute lymphoblastic leukemia with t(14;14)(q11;q32) identified by sequential R-banding and fluorescence in situ hybridization.* *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;152(2):141-5.
- Losada AP, Wessman M, Tiainen M, Hopman AH, Willard HF, Sole F, Caballin MR, Woessner S, Knuutila S. *Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia: an interphase cytogenetic study.* *Blood.* 1991;78(3):775-9.
- Lynch HT, Sanger WG, Pirruccello S, Quinn-Laquer B, Weisenburger DD. *Familial multiple myeloma: a family study and review of the literature.* *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(19):1479-83.
- Maia AT, van der Velden VH, Harrison CJ, Szczepanski T, Williams MD, Griffiths MJ, van Dongen JJ, Greaves MF. *Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins.* *Leukemia.* 2003;17(11):2202-6.
- Malumbres M, Barbacid M. *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm.* *Nat Rev Cancer.* 2009;9(3):153-66.
- 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;8(10):1640-5.
- Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, Hallek M, Wendtner CM. *Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia.* *Blood.* 2006;107(2):742-51.
- Meeker TC, Hardy D, Willman C, Hogan T, Abrams J. *Activation of the interleukin-3 gene by chromosome translocation in acute lymphocytic leukemia with eosinophilia.* *Blood.* 1990;76(2):285-9.
- Mertens D, Wolf S, Tschuch C, Mund C, Kienle D, Ohl S, Schroeter P, Lyko F, Dohner H, Stilgenbauer S, Lichter P. *Allelic silencing at the tumor-suppressor locus 13q14.3 suggests an epigenetic tumor-suppressor mechanism.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(20):7741-6.
- Mertens D and Stilgenbauer S. *CLL and deletion 13q14: merely the miRs?* *Blood.* 2012;119(13):2974-5.
- Montserrat E and Moreno C. *Genetic lesions in chronic lymphocytic leukemia: clinical implications.* *Curr Opin Oncol.* 2009;21(6):609-14.
- Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, Vance GH, Cherry AM, Higgins RR, Fielding AK, Foroni L, Paietta E, Tallman MS, Litzow MR, Wiernik PH, Rowe JM, Goldstone AH, Dewald GW, Adult Leukaemia Working Party, Medical Research Council/National Cancer Research Institute. *Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial.* *Blood.* 2007;109(8):3189-97.
- Moorman AV, Chilton L, Wilkinson J, Ensor HM, Bown N, Proctor SJ. *A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia.* *Blood.* 2010a;115(2):206-14.
- Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, Vora A, Mitchell CD, Harrison CJ. *Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial.* *Lancet Oncol.* 2010b;11(5):429-38.
- Moorman AV, Schwab C, Ensor HM, Russell LJ, Morrison H, Jones L, Masic D, Patel B, Rowe JM, Tallman M, Goldstone AH, Fielding AK, Harrison CJ. *IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia.* *J Clin Oncol.* 2012;30(25):3100-8.

Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK, Catovsky D. *Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b)*. Am J Clin Pathol. 1997;108(4):378-82.

Moreau P, Facon T, Leleu X, Morineau N, Huyghe P, Harousseau JL, Bataille R, Avet-Loiseau H, Intergroupe Francophone du Myelome. *Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy*. Blood. 2002;100(5):1579-83.

Mosca L, Fabris S, Lionetti M, Todoerti K, Agnelli L, Morabito F, Cutrona G, Andronache A, Matis S, Ferrari F, Gentile M, Spriano M, Callea V, Festini G, Molica S, Deliliers GL, Bicciato S, Ferrarini M, Neri A. *Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion*. Clin Cancer Res. 2010;16(23):5641-53.

Mougalian SS and O'Brien S. *Adverse prognostic features in chronic lymphocytic leukemia*. Oncology (Williston Park). 2011;25(8):692-9.

Mrozek K, Harper DP, Aplan PD. *Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia*. Hematol Oncol Clin North Am. 2009;23(5):991-1010.

Munshi NC, Anderson KC, Bergsagel PL, Shaughnessy J, Palumbo A, Durie B, Fonseca R, Stewart AK, Harousseau JL, Dimopoulos M, Jagannath S, Hajek R, Sezer O, Kyle R, Sonneveld P, Cavo M, Rajkumar SV, San Miguel J, Crowley J, Avet-Loiseau H. *Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2*. Blood. 2011;117(18):4696-700.

Nakazawa N, Nishida K, Tamura A, Kobayashi M, Iwai T, Horiike S, Nishigaki H, Otsuki T, Tomiyama Y, Fujii H, Kashima K, Taniwaki M. *Interphase detection of t(4;14)(p16.3;q32.3) by in situ hybridization and FGFR3 overexpression in plasma cell malignancies*. Cancer Genet Cytogenet. 2000;117(2):89-96.

Nickenig C, Lang NK, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T. *New insights into the biology of multiple myeloma using a combination of May-Grunwald-Giemsa staining and fluorescence in situ hybridization techniques at the single cell level*. Ann Hematol. 2001;80(11):662-8.

Nomdedeu JF, Lasa A, Ubeda J, Saglio G, Bellido M, Casas S, Carnicer MJ, Aventin A, Sureda A, Sierra J, Baiget M. *Interstitial deletions at the long arm of chromosome 13 may be as common as monosomies in multiple myeloma. A genotypic study*. Haematologica. 2002;87(8):828-35.

Nordgren A. *Hidden aberrations diagnosed by interphase fluorescence in situ hybridisation and spectral karyotyping in childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Leuk Lymphoma. 2003;44(12):2039-53.

Ouillet P, Erba H, Kujawski L, Kaminski M, Shedden K, Malek SN. *Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14*. Cancer Res. 2008;68(4):1012-21.

Parker H, Rose-Zerilli MJ, Parker A, Chaplin T, Wade R, Gardiner A, Griffiths M, Collins A, Young BD, Oscier DG, Strefford JC. *13q Deletion Anatomy and Disease Progression in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia*. Leukemia. 2011;25(3):489-97.

Parslow TG. 2002. *Inmunología básica y clínica*. 10a ed. El Manual Moderno. México D.F.

Paulsson K and Johansson B. *High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia*. Genes Chromosomes Cancer. 2009;48(8):637-60.

Perez-Simon JA, Garcia-Sanz R, Tabernero MD, Almeida J, Gonzalez M, Fernandez-Calvo J, Moro MJ, Hernandez JM, San Miguel JF, Orfao A. *Prognostic value of numerical chromosome*

aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. Blood. 1998;91(9):3366-71.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. *Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83(9):2934-8.

Pui CH, Relling MV, Downing JR. *Acute lymphoblastic leukemia.* N Engl J Med. 2004;350(15):1535-48.

Puiggros A, Delgado J, Rodriguez-Vicente A, Collado R, Aventín A, Luño E, Grau J, Hernandez JA, Marugán I, Ardanaz M, González T, Valiente A, Osma M, Calasanz MJ, Sanzo C, Carrió A, Ortega M, Santacruz R, Abrisqueta P, Abella E, Bosch F, Carbonell F, Solé F, Hernández JM, Espinet B; Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH) and Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC). *Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion.* Br J Haematol. 2013;163(1):47-54.

Pullarkat V, Slovak ML, Kopecky KJ, Forman SJ, Appelbaum FR. *Impact of cytogenetics on the outcome of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Southwest Oncology Group 9400 study.* Blood. 2008;111(5):2563-72.

Put N, Lemmens H, Wlodarska I, Konings P, Moreau Y, Hagemeijer A, Vandenberghe P, Michaux L. *Interphase fluorescence in situ hybridization on selected plasma cells is superior in the detection of cytogenetic aberrations in plasma cell dyscrasia.* Genes Chromosomes Cancer. 2010;49(11):991-7.

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia.* Blood. 1975;46(2):219-34.

Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton JA, Evans PA, O'Connor SJ, Richards SJ, Morgan GJ, Jack AS, Hillmen P. *Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts.* Blood. 2002a;100(2):635-9.

Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, Cullen M, Kennedy B, Richards SJ, Jack AS, Matutes E, Catovsky D, Hillmen P, Houlston RS. *Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion.* Blood. 2002b;100(7):2289-90.

Rawstron AC. *Monoclonal B-cell lymphocytosis.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:430-9.

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

Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, Formigaro L, Rizzotto L, Tammiso E, Saccenti E, Bardi A, Cavazzini F, Ciccone M, Nichele I, Pizzolo G, Zaja F, Fanin R, Galieni P, Dalsass A, Mestichelli F, Testa N, Negrini M, Cuneo A. *Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiological parameters.* Blood. 2012;119(10):2310-3.

Robinson HM, Taylor KE, Jalali GR, Cheung KL, Harrison CJ, Moorman AV. *t(14;19)(q32;q13): a recurrent translocation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.* Genes Chromosomes Cancer. 2004;39(1):88-92.

Ross FM and Stockdill G. *Clonal chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukemia patients revealed by TPA stimulation of whole blood cultures.* Cancer Genet Cytogenet. 1987;25(1):109-21.

Ross FM, Chiecchio L, Dagrada G, Protheroe RK, Stockley DM, Harrison CJ, Cross NC, Szubert AJ, Drayson MT, Morgan GJ, UK Myeloma Forum. *The t(14;20) is a poor prognostic*

factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance. Haematologica. 2010;95(7):1221-5.

Rudenko HC, Else M, Dearden C, Brito-Babapulle V, Jones C, Dexter T, Fenwick K, Mackay A, Ashworth A, Matutes E, Gonzalez D, Catovsky D, Morgan GJ. 2008. *Characterising the TP53-deleted subgroup of chronic lymphocytic leukemia: an analysis of additional cytogenetic abnormalities detected by interphase fluorescence in situ hybridisation and array-based comparative genomic hybridisation.* Leukemia & lymphoma 49:1879-1886.

Russell LJ, Akasaka T, Majid A, Sugimoto KJ, Loraine Karran E, Nagel I, Harder L, Claviez A, Gesk S, Moorman AV, Ross F, Mazzullo H, Strefford JC, Siebert R, Dyer MJ, Harrison CJ. *t(6;14)(p22;q32): a new recurrent IGH@ translocation involving ID4 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL).* Blood. 2008;111(1):387-91.

Russell LJ, De Castro DG, Griffiths M, Telford N, Bernard O, Panzer-Grumayer R, Heidenreich O, Moorman AV, Harrison CJ. *A novel translocation, t(14;19)(q32;p13), involving IGH@ and the cytokine receptor for erythropoietin.* Leukemia. 2009a;23(3):614-7.

Russell LJ, Capasso M, Vater I, Akasaka T, Bernard OA, Calasanz MJ, Chandrasekaran T, Chapiro E, Gesk S, Griffiths M, Guttery DS, Haferlach C, Harder L, Heidenreich O, Irving J, Kearney L, Nguyen-Khac F, Machado L, Minto L, Majid A, Moorman AV, Morrison H, Rand V, Strefford JC, Schwab C, Tonnies H, Dyer MJ, Siebert R, Harrison CJ. *Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.* Blood. 2009b;114(13):2688-98.

Russell LJ, Jones L, Erhorn A, Ensahei A, Masic D, Bentley H, Laczko KS, Harrison CJ. *Immunoglobulin heavy chain locus (IGH@) translocations in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL): incidence and risk stratification.* Blood (ASH Annual Meeting Abstract). 2012;120(21):1274a.

Ruvkun G. *Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world.* Science. 2001;294(5543):797-9.

Saez B, Martin-Subero JI, Odero MD, Prosper F, Hernandez R, Cigudosa JC, Siebert R, Calasanz MJ. *Interphase FISH for the detection of breakpoints in IG loci and chromosomal changes with adverse prognostic impact in multiple myeloma with normal karyotypes.* Cancer Genet Cytogenet. 2006;167(2):183-5.

Sandberg AA and Meloni-Ehrig AM. *Cytogenetics and genetics of human cancer: methods and accomplishments.* Cancer Genet Cytogenet. 2010;203(2):102-26.

Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives i Corrons JL. 2006. *Hematología clínica.* 5ª ed. Elsevier. Madrid.

Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S, Barlogie B. *Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma.* Cancer Genet Cytogenet. 1995;82(1):41-9.

Sawyer JR, Tricot G, Lukacs JL, Binz RL, Tian E, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. *Genomic instability in multiple myeloma: evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm 1q.* Genes Chromosomes Cancer. 2005;42(1):95-106.

Schnaiter A, Mertens D, Stilgenbauer S. *Genetics of chronic lymphocytic leukemia.* Clin Lab Med. 2011;31(4):649-58.

Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. 2009. *ISCN 2009: an International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* Karger. Basel.

Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, Jenkins RB, Paternoster SF, Smoley SA, Stockero KJ, Nast DM, Flynn HC, Tschumper RC, Geyer S, Zent CS, Call TG, Jelinek DF, Kay NE, Dewald GW. *Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia.* J Clin Oncol. 2006;24(28):4634-41.

- Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. *Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management*. *Leukemia*. 2010;24(3):512-20.
- Shaughnessy J, Tian E, Sawyer J, Bumm K, Landes R, Badros A, Morris C, Tricot G, Epstein J, Barlogie B. *High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH*. *Blood*. 2000;96(4):1505-11.
- Shaughnessy J, Jr, Gabrea A, Qi Y, Brents L, Zhan F, Tian E, Sawyer J, Barlogie B, Bergsagel PL, Kuehl M. *Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma*. *Blood*. 2001;98(1):217-23.
- Shaughnessy J, Jr, Tian E, Sawyer J, McCoy J, Tricot G, Jacobson J, Anaissie E, Zangari M, Fassas A, Muwalla F, Morris C, Barlogie B. *Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence in situ hybridization-defined chromosome 13 deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II*. *Br J Haematol*. 2003;120(1):44-52.
- Sindelarova L, Michalova K, Zemanova Z, Ransdorfova S, Brezinova J, Pekova S, Schwarz J, Karban J, Cmunt E. *Incidence of chromosomal anomalies detected with FISH and their clinical correlations in B-chronic lymphocytic leukemia*. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;160(1):27-34.
- Slovak ML, Bedell V, Pagel K, Chang KL, Smith D, Somlo G. *Targeting plasma cells improves detection of cytogenetic aberrations in multiple myeloma: phenotype/genotype fluorescence in situ hybridization*. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;158(2):99-109.
- Slovak ML. *Multiple myeloma: current perspectives*. *Clin Lab Med*. 2011;31(4):699-724.
- Soulier J, Trakhtenbrot L, Najfeld V, Lipton JM, Mathew S, Avet-Loiseau H, De Braekeleer M, Salem S, Baruchel A, Raimondi SC, Raynaud SD. *Amplification of band q22 of chromosome 21, including AML1, in older children with acute lymphoblastic leukemia: an emerging molecular cytogenetic subgroup*. *Leukemia*. 2003;17(8):1679-82.
- Soussi T and Lozano G. *P53 Mutation Heterogeneity in Cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(3):834-42.
- Stankovic T, Stewart GS, Fegan C, Biggs P, Last J, Byrd PJ, Keenan RD, Moss PA, Taylor AM. *Ataxia telangiectasia mutated-deficient B-cell chronic lymphocytic leukemia occurs in pregerminal center cells and results in defective damage response and unrepaired chromosome damage*. *Blood*. 2002;99(1):300-9.
- Stilgenbauer S and Dohner H. *Camptothecin-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy*. *N Engl J Med*. 2002;347(6):452-3.
- Stilgenbauer S and Dohner H. *Molecular genetics and its clinical relevance*. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2004;18(4):827-48.
- Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, Benner A, Leupolt E, Winkler D, Krober A, Kienle D, Lichter P, Dohner H. *Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival*. *Haematologica*. 2007;92(9):1242-5.
- Stockero KJ, Fink SR, Smoley SA, Paternoster SF, Shanafelt TD, Call TG, Zent CS, Van Dyke DL, Kay NE, Dewald GW. *Metaphase cells with normal G-bands have cryptic interstitial deletions in 13q14 detectable by fluorescence in situ hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;166(2):152-6.
- Struski S, Helias C, Gervais C, Audhuy B, Zamfir A, Herbrecht R, Lessard M. *13q deletions in B-cell lymphoproliferative disorders: frequent association with translocation*. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;174(2):151-60.

Tassano E, Acquila M, Tavella E, Micalizzi C, Panarello C, Morerio C. *MicroRNA-125b-1 and BLID upregulation resulting from a novel IGH translocation in childhood B-Cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. Genes Chromosomes Cancer. 2010;49(8):682-7.

Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH, Naucke S, Sawyer JR. *Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities*. Blood. 1995;86(11):4250-6.

Tsuchiya KD. *Fluorescence in situ hybridization*. Clin Lab Med. 2011;31(4):525-42.

Van Den Neste E, Robin V, Francart J, Hagemeijer A, Stul M, Vandenberghe P, Delannoy A, Sonet A, Deneys V, Costantini S, Ferrant A, Robert A, Michaux L. *Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine*. Leukemia. 2007;21(8):1715-22.

Van Dyke DL, Dewald GW, Call TG, Felinek DF, Zent CS, Shanafelt TD, Smoley SA, Stokero KJ, Kay NE. *Deletion 13 in B-CLL: interphase FISH reveals more 13q- than does CpG stimulation*. Blood (ASH Annual Meeting Abstract). 2007;110(11):2070a.

Van Dyke DL, Shanafelt TD, Call TG, Zent CS, Smoley SA, Rabe KG, Schwager SM, Sonbert JC, Slager SL, Kay NE. *A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol. 2010;148(4):544-50.

Van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. *Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts*. Cytometry B Clin Cytom. 2004;60(1):1-13.

Visone R, Rassenti LZ, Veronese A, Taccioli C, Costinean S, Aguda BD, Volinia S, Ferracin M, Palatini J, Balatti V, Alder H, Negrini M, Kipps TJ, Croce CM. *Karyotype-specific microRNA signature in chronic lymphocytic leukemia*. Blood. 2009;114(18):3872-9.

Walsh SH and Rosenquist R. *Immunoglobulin gene analysis of mature B-cell malignancies: reconsideration of cellular origin and potential antigen involvement in pathogenesis*. Med Oncol. 2005;22(4):327-41.

Wang MR, Perissel B, Malet P. *Rehybridization on metaphases studied previously by FISH. An approach to analyze chromosome aberrations*. Cancer Genet Cytogenet. 1995;85(1):58-60.

Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Muller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W. *Rapid immunophenotypic characterization of chromosomally aberrant cells by the new FICTION method*. Cytogenet Cell Genet. 1993;63(2):123-5.

Wetzler M, Dodge RK, Mrozek K, Stewart CC, Carroll AJ, Tantravahi R, Vardiman JW, Larson RA, Bloomfield CD. *Additional cytogenetic abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: a study of the Cancer and Leukaemia Group B*. Br J Haematol. 2004;124(3):275-88.

WHO, Swerdlow SH and International Agency for Research on Cancer. 2008. *World Health Organization. Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. IARC. Lyon.

Wilkens L, Varga S, Werner M, Nolte M, v Wasielewski R, Georgii A. *Short-term culturing influences the number of bcr/abl-fused cells detected by fluorescence in situ hybridisation in bone marrow aspirates of CML patients*. Pathobiology. 1999;67(4):163-8.

Wilkinson DG. 1998. *In Situ Hybridization. A practical approach*. 2nd ed. Oxford University Press. London.

Willis TG, Zalcborg IR, Coignet LJ, Wlodarska I, Stul M, Jadayel DM, Bastard C, Treleaven JG, Catovsky D, Silva ML, Dyer MJ. *Molecular cloning of translocation t(1;14)(q21;q32) defines a novel gene (BCL9) at chromosome 1q21*. Blood. 1998;91(6):1873-81.

Willis TG and Dyer MJ. *The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies*. Blood. 2000;96(3):808-22.

Woyach JA, Heerema NA, Zhao J, McFaddin A, Stark A, Lin TS, Andritsos LA, Blum KA, Flynn JM, Jones JA, Byrd JC. *Dic(17;18)(p11.2;p11.2) is a recurring abnormality in chronic lymphocytic leukaemia associated with aggressive disease*. Br J Haematol. 2010;148(5):754-9.

Wren C, Moriarty H, Marsden K, Tegg E. *Cytogenetic investigations of chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Genet Cytogenet. 2010;198(2):155-61.

Wuilleme S, Robillard N, Lode L, Magrangeas F, Beris H, Harousseau JL, Proffitt J, Minvielle S, Avet-Loiseau H, Intergroupe Francophone de Myelome. *Ploidy, as detected by fluorescence in situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma*. Leukemia. 2005;19(2):275-8.

Yuille MR, Houlston RS, Catovsky D. *Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia*. Leukemia. 1998;12(11):1696-8.

Zenz T, Habe S, Denzel T, Winkler D, Dohner H, Stilgenbauer S. *How little is too much? p53 inactivation: from laboratory cutoff to biological basis of chemotherapy resistance*. Leukemia. 2008;22(12):2257-8.

Zenz T, Habe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Buhler A, Sarno A, Groner S, Mertens D, Busch R, Hallek M, Dohner H, Stilgenbauer S. *Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial*. Blood. 2009a;114(13):2589-97.

Zenz T, Mohr J, Eldering E, Kater AP, Buhler A, Kienle D, Winkler D, Durig J, van Oers MH, Mertens D, Dohner H, Stilgenbauer S. *miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia*. Blood. 2009b;113(16):3801-8.

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

Zenz T and Stilgenbauer S. *CLL 17p deletion: more than 'miR'ly p53?* Blood. 2010;116(6):859-60.

Zenz T, Mertens D, Dohner H, Stilgenbauer S. *Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia*. Blood Rev. 2011;25(3):131-7.