

Evaluación del significado pronóstico del tamaño del clon con delección 13q14 en pacientes con leucemia linfocítica crónica

Prognostic significance of the percentage of 13q14 deletion in patients with chronic lymphocytic leukemia

Palau Nagore V¹, Brizuela B¹, Giere I², Stella F¹, Stanganelli C³, Bezares R⁴, Rodríguez A³, Pavlovsky C², Pavlovsky MA², Slavutsky I¹.

¹Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

²FUNDALEU, Buenos Aires, Argentina.

³División Patología Molecular, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

⁴Servicio de Hematología, Hospital Álvarez, Buenos Aires, Argentina.

islavutsky@hematologia.anm.edu.ar

Trabajo presentado en sesión plenaria a premio en marco del XXIII Congreso Argentino de Hematología.

Fecha recepción: 15/03/2018

Fecha aprobación: 10/04/2018



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA
Volumen 22 n° 1: 21-27
Enero - Abril 2018

Palabras claves: leucemia linfocítica crónica, delección 13q14, evolución clínica.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, 13q14 deletion, clinical evolution.

Resumen

El análisis de los rearrreglos genómicos mediante FISH (*fluorescence in situ hybridization*) constituye uno de los factores pronóstico más importantes en leucemia linfocítica crónica (LLC). La delección de parte del brazo largo del cromosoma 13, del13q14, es la anomalía más frecuente, encontrándose asociada a pronóstico favorable cuando se presenta como única alteración. La literatura muestra diferencias importantes en el significado clínico del porcentaje de células con esta alteración (60-85%). En el

presente trabajo se analizó el tamaño del clon con del13q14 como única alteración y su relación con la evolución clínica de los pacientes. Se evaluó un total de 263 pacientes de los cuales 65 casos (24,7%) mostraban del13q14 como única alteración. Se realizó cultivo de linfocitos de sangre periférica (SP) estimulado para el análisis citogenético y por FISH empleando el panel de sondas para LLC. Se efectuó el análisis de *IGHV* (*immunoglobulin heavy chain variable region*) mediante RT-PCR y secuenciación.

Las curvas de sobrevida (SV) fueron efectuadas con el método de Kaplan-Meier y comparadas con el test de Log-rank. Para todas las evaluaciones se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. El estudio fue aprobado por los Comités de Ética de cada Institución. Todos los individuos proporcionaron su consentimiento informado. De los 65 pacientes, 48 (73,8%) presentaron del13q14 monoalélica y 17 (26,2%) bialélica. En 32 casos se evaluó *IGHV* siendo mutado en el 79,2% de los mismos. La distribución de casos acorde al tamaño del clon con del13q14 fue: 10-40% (17), 41-70% (21), 71-100% (27). No se observaron diferencias entre los dos primeros grupos por lo que fueron analizados en conjunto (10-70%). Al efectuar el análisis

tomando como punto de corte el 70% de células patológicas, se observó mayor recuento de glóbulos blancos y del porcentaje de linfocitos, incremento de $\beta 2M$ ($p \leq 0,01$) y menores niveles de hemoglobina ($p = 0,006$) en los casos con $>70\%$ de células con del13q14 respecto de aquellos con menor número de células leucémicas con dicha alteración, así como una SV libre de tratamiento significativamente más corta en el último grupo ($p < 0,05$). A nuestro conocimiento, el presente constituye el primer análisis del significado clínico del tamaño del clon con del13q14 de nuestro país, aportando un valor de referencia para el seguimiento de los pacientes con LLC, y contribuyendo a la caracterización biológica de la patología.

Abstract

Genomic alterations are one of most important prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Among them, 13q14 deletion (del13q14) is the most frequent genetic anomaly, associated to a favorable prognosis when it is a sole alteration. However, data of the literature support that patients with isolated del13q14 do not constitute a homogeneous group. Different studies suggest a relatively worse clinical behavior for patients carrying higher percentages of del13q14 nuclei, with results ranging between 60% to 85% abnormal leukemic cells. In this study, we have evaluated the percentage of leukemic cells with isolated del13q14 in CLL patients in order to identify subsets with a different progression risk. A total of 65 CLL cases with isolated del13q14 by interphase FISH, were studied. Chromosome analysis was performed on stimulated peripheral blood lymphocytes cultures. FISH study was performed using the CLL panel according to manufacturer's protocol. *IGHV* (immunoglobulin heavy chain variable region) mutational status was analyzed by RT-PCR and bidirectional sequencing. The study was approved by the local Ethics Committees. All individuals provided their written informed consent. By FISH, the median percentage of nuclei with del13q14 was 57.5% (range: 13%-98%). A monoallelic

deletion was observed in 48 cases (73.8%) while 17 (26.2%) patients showed a biallelic condition. The distribution of cases according to the percentage of cells with del13q14 was: 11%-40% (17), 41%-70% (21) and 71%-100% (27). Statistical analysis identified 70% of nuclei carrying del13q14 as the most appropriate cutoff in our series. The analysis of clinical characteristics showed significant increase of white blood cells count ($p = 0.01$), percentage of lymphocytes ($p = 0.009$) and Beta 2 microglobuline ($p = 0.011$) as well as a decrease in the hemoglobin levels ($p = 0.006$) in cases with $>70\%$ of deleted nuclei compared to those with $<70\%$. In addition, a significantly short treatment free survival (TFS) was observed in the cohort of patients with losses of 13q14 in more than 70% of cells (54.5 months) compared to those with $<70\%$ of abnormal nuclei (98 months) ($p < 0.05$). To our knowledge, this is the first study about the clinical significance of the percentage of leukemic cells with del13q14 in CLL patients in our country. Our results showed significant differences in clinical parameters as well as a shorter TFS for patients with more than 70% of cells with this alteration, providing a reference value for clinical practice and contributing to the biological characterization of the disease.

Introducción

La leucemia linfocítica crónica (LLC) constituye la neoplasia a células B maduras más frecuente en Occidente representando aproximadamente el 30% de las leucemias del adulto. Esta entidad presenta un curso clínico altamente variable con un amplio rango de sobrevida, entre unos pocos meses y más de una década a partir del diagnóstico⁽¹⁾. Un aspecto característico de la LLC es la variabilidad en la evolución clínica de los pacientes, con casos que muestran larga sobrevida con poco requerimiento terapéutico y otros que presentan rápida progresión de la enfermedad a pesar de los tratamientos específicos, no siendo suficientes los sistemas de estadiación y los parámetros biológicos disponibles para predecir este comportamiento diferente. En las últimas décadas los avances en la comprensión de las características genéticas y la biología molecular de la LLC han permitido la identificación de marcadores asociados con riesgo de progresión y sobrevida, aportando información pronóstica complementaria de importancia en la evolución clínica de los pacientes.

En este aspecto resulta de interés el análisis de los rearrreglos genómicos. A nivel citogenético, los estudios cromosómicos permiten detectar alteraciones clonales en el 40-50% de los casos, valor que asciende al 80% cuando se emplea la técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), permitiendo establecer diferentes grupos de riesgo. Entre ellos, las deleciones de 11q22, lugar donde se ubica el gen *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*) y 17p13 (*TP53*) se encuentran relacionadas a mala evolución clínica y escasa respuesta al tratamiento, la trisomía 12 presenta un pronóstico intermedio, en tanto que la deleción monoalélica de 13q14 (*del13q14*), lugar donde mapean los microRNAs *miR-15a/16-1*, es la anomalía más frecuente (~55% de los pacientes), asociada a buen pronóstico cuando se encuentra como única alteración^(2,3). No obstante, datos de la literatura han mostrado heterogeneidad en este último grupo, con algunos pacientes que presentan un curso muy indolente y otros una evolución clínica desfavorable. Asimismo, se ha observado variabilidad en el porcentaje de los núcleos con *del13q14*, en el patrón de deleción, mono- o bialélico, así como en el tamaño de la misma, habiéndose sugerido un peor pronóstico para los pacientes que presentan altos porcentajes de células con *del13q14*, con valo-

res que van del 60% al 85%⁽³⁻⁸⁾. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue analizar el porcentaje del clon leucémico portador de *del13q14* como única alteración en nuestra población de pacientes con LLC tendiente a establecer su relación con las características biológicas y la evolución clínica, a fin de identificar subgrupos de pacientes con diferente riesgo de progresión de la enfermedad.

Materiales y métodos

POBLACIÓN ESTUDIADA. Se analizó un total de 65 pacientes con LLC portadores de *del13q14* como única alteración (40 varones; edad media: 62,3 años; rango: 36-83 años; estadios clínicos: 0: 45,6%; I-II: 41,4%; III-IV: 13%). El diagnóstico se efectuó teniendo en cuenta los criterios establecidos en el Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia⁽⁹⁾. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Todos los pacientes prestaron su consentimiento informado. El protocolo de estudio se efectuó conforme a las normas éticas establecidas en la declaración de Helsinki 1975.

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS. El análisis cromosómico se realizó mediante cultivo de linfocitos de sangre periférica (SP) en medio F-12 suplementado con 15% de suero fetal bovino y estimulado con los mitógenos *Phytolacca Americana* (Sigma, USA) y *Oligo DSP30* (Integrated DNA Technologies, Buenos Aires, Argentina), a 37°C, durante 96 hs y 72 hs, respectivamente. Los preparados se analizaron empleando la técnica de bandeado G con tripsina al 1% y coloración con Wright, con posterior observación al microscopio. Se empleó la nomenclatura establecida en el ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature)⁽¹⁰⁾.

HIBRIDACIÓN IN SITU POR FLUORESCENCIA (FISH). El análisis citomolecular se efectuó en el mismo material empleado para el estudio citogenético utilizando las sondas SE12, OLE13q14 D13S319, OLE 11q22.3 ATM y OLE 17p13.1 TP53 (LiVE-LE-CEL, Buenos Aires, Argentina), acorde al protocolo establecido por el proveedor. Las muestras se evaluaron al microscopio de fluorescencia empleando filtros apropiados, efectuándose el análisis de al menos 200 núcleos interfásicos por paciente para cada sonda. Los puntos de corte utilizados

(media de controles normales + 3 desvíos estándar), determinados a partir de 10 individuos sanos, fueron: 3.02%, 10.2%, 7.7% and 5.5% para trisomía 12 y monosomías de D13S319, ATM y TP53, respectivamente.

ESTADO MUTACIONAL DE *IGVH*. Las secuencias del gen *IGVH* (*immunoglobulin heavy chain variable region*) fueron determinadas acorde a lo previamente descrito⁽¹¹⁾. Sucintamente, se trabajó a partir de ADNc obtenido de muestras de SP, efectuándose amplificación mediante 6 reacciones de PCR por cada muestra con *primers* sentido específicos de cada familia (VH₁-VH₆) y un único *primer* consenso antisentido J_H. Cuando la amplificación de estos fragmentos no resultó satisfactoria, se procedió a la amplificación con *primers* sentido para las secuencias de la región líder (LH₁-LH₆) y un único *primer* antisentido C_μ. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV, seguido de purificación empleando GFX PCR DNA and gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). Los productos purificados fueron secuenciados en un secuenciador automático, empleándose las bases de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/>) e IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>), para la identificación de los segmentos clonales y el porcentaje de homología con la línea germinal. Se consideraron como no mutadas (NM) las secuencias con una homología $\geq 98\%$ respecto de la línea germinal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO. Se empleó el test de Mann-Whitney para la comparación de los resultados entre los diferentes subgrupos de pacientes. Para el análisis de las características clínicas de los pacientes se utilizó el test t' de Student (para las variables cuantitativas) y la prueba de χ^2 o el test exacto de Fisher (para las variables categóricas). Las curvas de supervivencia (SV) fueron efectuadas con el método de Kaplan-Meier y comparadas con el test de log-rank. Para todas las evaluaciones se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

El análisis citomolecular sistemático de 263 pacientes con LLC no seleccionados empleando el panel de sondas de FISH de la patología permitió detectar 65 casos (24,7%) con delección 13q14 como única

anomalía. En 50 pacientes se efectuó estudio citogenético, observándose cariotipo normal en el 82% de los mismos, en tanto que 4 casos mostraron del13q14 por citogenética, dos pacientes presentaron cariotipo simple con del6q, uno mostró inestabilidad genómica y dos anomalías numéricas. En 32 casos se contó con muestra para efectuar el estudio del estado mutacional y los rearrreglos de *IGHV*, observándose 75% de los pacientes con *IGHV* mutada (M) y 25% NM. La distribución de familias VH fue: VH3>VH4>VH1=VH5, siendo los genes más representados: *IGHV4-59* (12,5% de los casos), *IGHV3-23*, *IGHV3-33* e *IGHV4-61* (9,4% cada uno), con una frecuencia de receptores esterotipados de 12,5%.

El análisis por FISH mostró un porcentaje medio de núcleos con del13q14 de 57,5% (rango: 13%-98%). En 48 (73,8%) casos se observó delección monoalélica, en tanto que 17 (26,2%) pacientes mostraron pérdida de ambos alelos. La distribución de casos acorde al tamaño del clon con del13q14 fue: 11-25% (11), 26-40% (6), 41-55% (10), 56-70% (11), 71-85% (15) y >85% (12). Dado el número limitado de algunos grupos, los mismos fueron reagrupados en tres categorías: 10-40%, 41-70% y 71-100% (**Tabla 1**). No se observaron diferencias en los parámetros clínicos ni en la supervivencia libre de tratamiento (SLT) entre los dos primeros por lo que se los consideró como un único grupo, efectuándose el análisis tomando como punto de corte 70% de células con del13q14. La distribución de las pérdidas mono y bialélicas fue comparable en ambos grupos (**Tabla 2**).

Tabla 1. Distribución de casos acorde al tamaño del clon con del13q14

| Grupo (%) | Nº de casos (%) |
|-----------|-----------------|
| 11-40 | 17 (26,2) |
| 41-70 | 21 (32,3) |
| 71-100 | 27 (41,5) |

Tabla 2. Distribución de casos con delección mono- y bialélica

| Grupo (%) | Delección monoalélica (%) | Delección bialélica (%) |
|-----------|---------------------------|-------------------------|
| 11-70 | 76,3 | 23,7 |
| 71-100 | 70,4 | 29,6 |

El análisis de los factores pronóstico de la patología mostró aumento significativo del recuento total de blancos ($p=0,01$), del porcentaje de linfocitos ($p=0,009$) y de beta 2 microglobulina ($\beta 2M$)

($p=0,011$), y una disminución en los niveles de hemoglobina ($p=0,006$) en los casos con $>70\%$ respecto de aquéllos con menor porcentaje (**Tabla 3**).

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes acorde al tamaño del clon leucémico

| Características | <70% cél con del13q14 | >70% cél con del13q14 | p |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Nº de pacientes (n) | 38 | 27 | |
| Sexo F/M | 13/25 | 12/15 | |
| Edad (años) Media (rango) | 64,5 (40-80) | 60,5 (36-80) | $p=0,360$ |
| Estadios clínicos (%) | | | |
| Rai 0 | 57,7 | 30 | $p=0,095$ |
| Rai I-II | 34,6 | 50 | |
| Rai III-IV | 7,7 | 20 | |
| Leucocitos totales ($\times 10^9/L$) Media (rango) | 25,9 (8,3-77,8) | 43,4 (12,6-97,8) | $p=0,010$ |
| % linfocitos Media (rango) | 71,2 (32-90) | 80,3 (65-95) | $p=0,009$ |
| Plaquetas ($\times 10^9/L$) Media (rango) | 189,6 (67-300) | 170,4 (60-331) | $p=0,282$ |
| Hb (g/dL) Media (rango) | 13,8 (11-15,8) | 12,5 (8,5-15,1) | $p=0,006$ |
| $\beta 2M$ ($\mu g/ml$) Media (rango) | 2,1 (1,1-7,5) | 3,4 (1,9-7) | $p=0,011$ |
| LDH (UI/L) Media (rango) | 342,7 (170-500) | 373,7 (250-647) | $p=0,393$ |

F: femenino; M: masculino; LDH: lactato dehidrogenasa; $\beta 2M$: $\beta 2$ microglobulina; Hb: hemoglobina

El 75% de los casos con alto nivel de del13q14 requirió tratamiento respecto del 46,7% de aquéllos con $<70\%$. Asimismo, se observó una menor SLT en los pacientes con $>70\%$ de núcleos anormales (54.5 meses) respecto de aquéllos con $<70\%$ (98 meses) ($p<0,05$) (**Figura 1**), pudiendo considerarse este valor como referencia para la práctica clínica en nuestro medio.

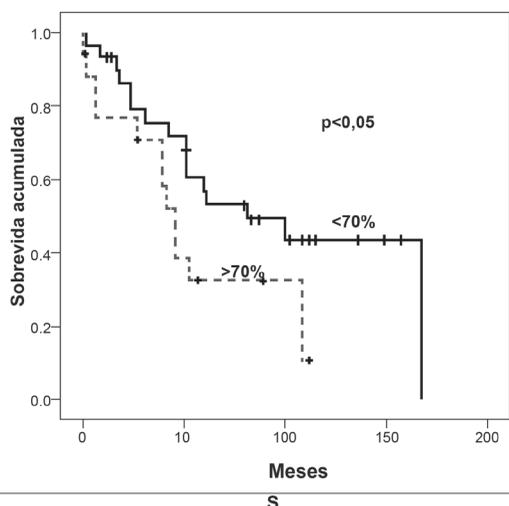


Figura 1. Curvas de supervivencia libre de tratamiento en pacientes con LLC con $>70\%$ y $<70\%$ de células con del13q14 ($p<0,05$).

Discusión

Diferentes estudios en LLC han demostrado una asociación importante entre cambios genéticos y evolución clínica, siendo la del13q14 como única anomalía, la que presenta mejor pronóstico respecto de las otras categorías de riesgo citogenético^(2,3). No obstante, distintos autores muestran que este subgrupo de pacientes es clínicamente heterogéneo⁽³⁻⁸⁾, por lo que resulta de importancia poder identificar aquellos casos con mayor riesgo de desarrollar enfermedad progresiva, tendiente a efectuar un correcto seguimiento de los mismos. En el presente trabajo se realizó la evaluación del porcentaje del clon neoplásico en nuestra cohorte de pacientes con LLC, pudiendo determinarse que la presencia de más del 70% de células portadoras de del13q14 se asocia a una peor evolución clínica, con una SLT significativamente menor, sustentando que el número de células leucémicas con esta alteración influencia el curso clínico de la enfermedad. Simultáneamente, nuestro estudio permitió confirmar la heterogeneidad de este subgrupo de pacientes, ya que los casos con $>70\%$ de células con del13q14 presentaron mayor recuento de glóbulos blancos y del porcentaje de linfocitos, incremento de $\beta 2M$ y

menores niveles de hemoglobina, respecto de aquellos con menor número de células leucémicas con dicha alteración. Asimismo, el presente análisis mostró que el 75% de los pacientes con del13q14 presentaba *IGHV*-M, valor por encima del 55,7% que caracteriza a nuestra población total de pacientes en los que se analizó el estado mutacional de *IGHV*⁽¹²⁾, respaldando su asociación con un pronóstico inicialmente favorable.

Diferentes trabajos han evaluado la relación entre el porcentaje de núcleos portadores de del13q14 y la evolución de la enfermedad. Un primer estudio⁽⁴⁾ observó peor evolución clínica en aquellos pacientes que presentaban >80% de células con del13q14, subgrupo que además mostraba sobreexpresión de genes relacionados con proliferación celular y actividad de MAP (*mitogen-activated protein*) kinasas así como baja expresión de genes relacionados con apoptosis y arresto del ciclo celular. Posteriormente, Van Dyke y col⁽⁵⁾ detectaron como punto de corte 65,5% de núcleos anormales, en tanto que otros dos trabajos encontraron diferencias en los casos con más del 70% de células patológicas^(6,7). Finalmente, dos publicaciones recientes^(3,8) encontraron puntos de corte muy diferentes (60% y 85,5%, respectivamente), poniendo de manifiesto la diversidad de este aspecto y resaltando la importancia de contar con un valor de referencia para nuestra población de pacientes con LLC. En este contexto, nuestro estudio permite definir para nuestro medio la presencia de más del 70% de células con del13q14 como valor de referencia para el riesgo de progresión clínica de la enfermedad.

Concluyendo, a nuestro conocimiento, el presente constituye el primer análisis del significado clínico del tamaño del clon con del13q14 en pacientes con LLC de nuestro país. Nuestros datos muestran diferencias significativas en los parámetros clínicos así como una SLT significativamente más corta en los pacientes con clones con más del 70% de las células con esta alteración, aportando un valor de referencia para el seguimiento de los pacientes con LLC, y contribuyendo a la caracterización biológica de la patología.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó con fondos de CONICET, Agencia Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (ANPCyT) e Instituto Nacional de Cáncer.

Declaración de conflictos de interés

Miguel Pavlovsky: declara haber recibido honorarios por parte de Novartis, Janssen, Abbvie y Roche por conferencias en las que ha participado y declara haber recibido honorarios por parte de Raffo, Roche y Janssen en concepto de actividades educativas en las que ha participado. El resto de los autores declara no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2008; 371: 1017-29.
2. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A y col. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343:1910-6.
3. Van Dyke DL, Werner L, Rassenti LZ y col. The Döhner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol*. 2016; 173: 105-13.
4. Hernández JA, Rodríguez AE, González M, y col. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2009; 94: 364-71.
5. Van Dyke DL, Shanafelt TD, Call TG y col. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010; 148: 544-50.
6. Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D y col. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chrom Cancer*. 2011; 50: 633-43.
7. Orlandi EM, Bernasconi P, Pascutto C y col. Chronic lymphocytic leukemia with del13q14 as the sole abnormality: dynamic prognostic estimate by interphase-FISH. *Hematol Oncol*. 2013; 31: 136-42.
8. Huang SJ, Gillan TL, Gerrie AS y col. Influence of clone and deletion size on outcome in chronic lymphocytic leukemia patients with an isolated deletion 13q in a population-based analysis in British Columbia, Canada. *Genes Chrom Cancer*. 2016; 55: 16-24.

9. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D y col. 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: 5446-56.
10. ISCN. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Ed: Jean McGowan-Jordan, Annet Simons, Michael Schmid. *Cytogenet Genom Res*. 2016 ; 149 : 1-140.
11. Stanganelli C, Travella A, Bezares R y col. Immunoglobulin gene rearrangement and mutational status in Argentinian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013; 13: 447-57.
12. Stanganelli C, Dos Santos P, Panero J y col. Análisis del estatus mutacional y rearreglos del gen *IGHV* en pacientes con leucemia linfocítica crónica y linfoma de células del manto. *Hematología*. 2016; 20: 274-83.