



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGÍA

LA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA: EVOLUCIÓN CLONAL Y SU MONITORIZACIÓN MOLECULAR

Tesis Doctoral presentada por:

ALICIA SERRANO ALCALÁ

Dirigida por:

Dr. Felipe Javier Chaves Martínez

Dra. Blanca Natividad Navarro Cubells

Dra. María José Terol Casterá

Tutor:

Dr. Juan Sastre Belloch

Valencia, Febrero 2023



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

INCLIVA | VLC
Instituto de Investigación Sanitaria

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGIA

LA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA: EVOLUCIÓN CLONAL Y SU MONITORIZACIÓN MOLECULAR

Tesis Doctoral presentada por:

ALICIA SERRANO ALCALÁ

Dirigida por:

Dr. Felipe Javier Chaves Martínez

Dra. Blanca Natividad Navarro Cubells

Dra. María José Terol Casterá

Tutor:

Dr. Juan Sastre Belloch

Valencia, Febrero 2023



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

INCLIVA | VLC
Instituto de Investigación Sanitaria

D. Felipe Javier Chaves Martínez, Director unidad de genómica y diagnóstico genético. Unidad de Genómica y Diabetes, Instituto de Investigación Sanitaria Valencia (INCLIVA).

Dña. Blanca Natividad Navarro Cubells, Facultativo especialista en Hematología. Departamento de Fisiología, Universidad de Valencia.

Dña. María José Terol Casterá, Facultativo especialista en Hematología. Departamento de Medicina/ Servicio de Hematología, Universidad de Valencia/ Hospital Clínico Universitario Valencia/Instituto de Investigación Sanitaria Valencia (INCLIVA).

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada **“La Leucemia Linfocítica Crónica: Evolución clonal y su monitorización molecular”**, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección **por Dña. Alicia Serrano Alcalá**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a Febrero 2023.

Fdo. Dr. Felipe Javier Chaves Martínez Fdo. Dra. Blanca Natividad Navarro Cubells

Fdo. Dra. María José Terol Casterá

*“La piel se arruga, el pelo se torna blanco, los días se convierten en años,
la vida pasa... pero nuestra fuerza, constancia y disciplina no tienen edad,
son el puente entre nuestras metas y nuestros logros.
Si podemos soñarlo, podemos hacerlo:
Voy a volar dijo el gusano... todos rieron excepto la mariposa”.*
Sólo tú, Mamá.

Agradecimientos

Estas líneas reflejan mi más profundo y sincero agradecimiento: a ti, a vosotras, a vosotros, los verdaderos protagonistas de esta aventura.

A Blanca y Maria José, mis directoras de tesis. Gracias por darme la oportunidad de adentrarme en el mundo laboral, por ayudar a desarrollarme como profesional y por depositar en mí vuestra confianza desde el principio. Gracias Javier, mi codirector, por haberme mostrado mi gran pasión, el diagnóstico genético.

Al personal del Servicio de Hematología, y en particular al de la Unidad de Biología Molecular. A ti Blanca Ferrer, por dejarme caminar a tu lado, por transmitirme tu optimismo, intensidad y entusiasmo, por entrever tus pensamientos y dejarme entenderte con la mirada. A Fernandito, mi melón, gracias por ser mi padre valenciano, por tu cariño, por tu humor, por ser el alma del laboratorio. A ti Pilar, por combatir juntas las numerosas hazañas que el mundo de las inmunoglobulinas nos ha comprometido. A mis sanitadoras, Pauli y Julia, compañeras y amigas, gracias por vuestros consejos, nuestros ratitos en el zulo, por dejarme liaros, y dejar ser liadas, por mostrarme cómo sois, y lo mucho que os necesito. A las moleculares de calidad, Laurinchi, Clara y Rut, por transmitir vitalidad y dulzura por cada rincón, por demostrar valentía y por confiar en mí para ayudaros en la que ahora, es vuestra aventura.

A mis chiquis, Azahara, Carol y Veronik. No sois mera casualidad, sois la causa de mi efecto, las detonantes de mi evolución. Sois terapia, tiempo y dedicación, la combinación perfecta para madurar mi esencia, una pizca de mi y todo de vosotras. Orgullosa de lo que sois, de en lo que os habéis convertido, y ansiosa por dejarme ser testigo de hasta dónde queréis llegar.

A vosotros, Papá y Mamá, mis personas favoritas, sois mi razón, alma y corazón. Mis referentes, mi mayor debilidad y gran fortaleza, gracias por mantenerme con los pies en el suelo y proporcionarme alas para tocar el cielo. A mi Sis, por ser el reflejo que en mi espejo siempre he buscado. A mi compañero de viaje, mi Grut, por el tiempo robado, por creer en mí, por enseñarme que yo, soy sólo yo, y que juntos somos uno. Por vosotros, os quiero.

Este triunfo también es vuestro.

Índice

Agradecimientos.....	9
Lista de abreviaturas.....	V
Lista de tablas.....	IX
Lista de figuras.....	X
1 Introducción.....	19
1.1 Linfopoyesis: desarrollo de los linfocitos B.....	20
1.1.1 Neoplasias de linfocitos B maduros: Linfomas no Hodgkin.....	22
1.1.2 Señalización mediada por BCR en los linfocitos B: activación crónica en neoplasias linfoides. 24	
1.2 Leucemia Linfática Crónica (LLC).....	27
1.2.1 <i>Características de la LLC: definición y criterios diagnósticos.</i>	27
1.2.2 <i>Pronóstico en la LLC: estimación en situaciones de incertidumbre.</i>	28
1.2.3 <i>Modelos pronósticos integrados: estratificación del riesgo</i>	35
1.2.4 <i>Predicción en LLC: lo que se espera que puede suceder</i>	36
1.3 Base molecular de la heterogeneidad intratumoral y evolución clonal de la LLC.....	44
1.3.1 <i>Evolución clonal: Darwin y más allá.</i>	45
2 Hipótesis y Objetivos.....	53
2.1 Hipótesis.....	53
2.2 Objetivos.....	54
3 Metodología.....	57
3.1 Pacientes de la cohorte.....	57
3.2 Recolección y procesamiento de muestras.....	58
3.3 Estudio del perfil genético y alteraciones moleculares.....	58
3.3.1 <i>Primera fase:</i>	59
3.3.2 <i>Segunda fase:</i>	61
3.3.3 <i>Tercera fase:</i>	63
3.3.4 <i>Filtrado y análisis de variantes.</i>	64
3.4 Pruebas de validación: panel IBR-R.....	64

3.5	Estudio de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGVH)..	65
3.5.1	<i>Determinación de IGVH: secuenciación Sanger (Sseq).</i>	65
3.5.2	<i>Determinación de IGVH y seguimiento: método NGS.</i>	67
3.6	Citometría de Flujo y enfermedad medible residual.....	67
3.7	Análisis estadístico.....	68
4	Resultados.....	71
4.1	Características clínico biológicas de los pacientes al diagnóstico y al inicio del tratamiento.	71
4.1.1	<i>Análisis de calidad de secuenciación y cobertura en las muestras basales.</i>	73
4.1.2	<i>Comparación del estado mutacional IGVH por Sseq y NGS.</i>	75
4.1.3	<i>Heterogeneidad clonal y composición subclonal.</i>	77
4.1.4	<i>Mutaciones genéticas y vías celulares más frecuentemente alteradas.</i>	78
4.1.5	<i>Coexistencia/exclusividad de las variantes genéticas y su correlación con las características clínico biológicas.</i>	81
4.2	Perfil molecular según los grupos de riesgo LLC-IPI e impacto clínico en el TPT.....	83
4.3	Evolución clonal tras primera línea: terapia convencional vs terapia dirigida.....	85
4.3.1	<i>Estudio de mutaciones de resistencia asociadas a los genes BTK y PLCγ2.</i>	86
4.3.2	<i>Análisis de calidad de secuenciación y cobertura en el seguimiento.</i>	89
4.3.3	<i>Inmunoquimioterapia.</i>	90
4.3.4	Terapia dirigida: Ibrutinib.....	96
4.3.5	Análisis de supervivencia: esquema terapéutico en primera línea de tratamiento.	103
4.4	Evaluación del estado mutacional de IGVH por NGS.	105
4.4.1	<i>Seguimiento del clon mayoritario en las muestras secuenciales por NGS.</i>	105
4.4.2	<i>Detección de la enfermedad mínima residual por CF e IGVH NGS.</i>	107
4.5	Evolución clonal subyacente a la progresión de la LLC y transformación Richter....	109
5	Discusión.....	117
5.1	Evolución clonal, tratamiento y tiempo.	122
5.2	Enfermedad medible residual en la LLC: algunas respuestas, muchas preguntas. ..	129
6	Conclusiones.....	133
7	Proyección científica	137

8	Bibliografía.....	141
9	Anexo: tablas.....	163
9.1	Anexo 1: Materiales y métodos.....	163
9.2	Anexo 2: Resultados.....	165
10	Anexo: figuras.....	198
10.1	Anexo 1: Resultados.....	198

Lista de abreviaturas

Ab	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ag	Antígeno
AID	Enzima deaminasa de citosina inducida por activación
ARN	Ácido ribonucleico
ASO-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa aloespecifica
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2
BCR	Receptor transmembrana de la célula B
BLNK	Proteína enlazadora de células B
B-NHL	Linfomas no Hodgkin de células B
BR	Bendamustina y Rituximab
BTK	Tirosina quinasa de Bruton
β 2M	Beta-2 microglobulina
CARD11	Proteína con dominio de reclutamiento de caspasa 11
CCF	Fracción de células cancerosas
CD79 α	Protein- α , Ig α
CD79 β	Protein- β , Ig β
CDR	Regiones determinantes de complementariedad
CF	Citometría de flujo
c-IAP2	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
CLP	Progenitores linfoides comunes
CMP	Progenitores mieloides comunes
CN	Fosfatasa calcineurina
CSR	Conmutación de cambio de inmunoglobulina
CV	Coefficiente de variación
DAG	Diacilglicerol
DdPCR	Digital Droplet PCR
DS	Desviación estándar
DSB	Roturas de doble cadena
EMR	Enfermedad medible residual
EMRi	Enfermedad medible residual indetectable
FCR	Fludarabina, Ciclofosfamida y Rituximab
fcRIIB	Receptor Fc de la Ig
FISH	Fluorescence in situ hybridization
GC	Centro germinal
GMP	Progenitores de granulocitos/macrófagos
Hb	Hemoglobina
HL	Linfomas hodgkin
HR	Hazard ratio
HSC	Células madre hematopoyéticas
iBTK	Inhibidor de BTK

IC	Intervalo de confianza
IG	Inmunoglobulina
IGDH	Región diversa de la cadena pesada de las inmunoglobulinas
IGL	Cadena ligera de las inmunoglobulinas
IGH	Cadena pesada de las inmunoglobulinas
IGJH	Región unión de la cadena pesada de las inmunoglobulinas
IGVH	Región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas
IP3	Inositol trifosfato
iPI3K	Inhibidor de la PI3K
IQT	Inmunoquimioterapia
ITAMS	Motivos de activación basados en inmunorreceptores de tirosina
iwCLL	International Workshop on CLL
LBM	Linfocitosis de células B monoclonales
LDCGB	Linfoma difuso de células grandes
LLC	Leucemia linfocítica crónica
LLCP	Linfoma linfocítico de célula pequeña
LLC-IPI	Índice pronóstico internacional LLC
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMPP	Progenitores linfoide-mieloide
Mdm2	Murine doble minute 2
MEP	Progenitores eritroides/megacariocíticos
M-LLC	Paciente LLC mutado para IGVH
MO	Médula ósea
MPP	Células progenitoras multipotentes
NFAT	Factor nuclear de activación células T
NF- κ B	Factor nuclear- κ B
NGS	Secuenciación de nueva generación
NHL	Linfomas no Hodgkin
NK	Natural killer
OR	Odds ratio
pb	Pares de bases
PI3K	Enzima fosfoinosítido 3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKC β	Proteína quinasa C β
PLC γ 2	Fosfolipasa C γ 2
pre-BCR	Receptor pre-B
RC	Remisión completa
RIQ	Rango intercuartil
RLA	Recuento linfocitario absoluto
RSS	Secuencias señal de recombinación
SG	Supervivencia global
SHM	Hipermutación somática
SLP	Supervivencia libre de progresión
SP	Sangre periférica

Sseq	Secuenciación Sanger
SYK	Spleen tyrosine kinase
TD	Terapia dirigida
TdT	Enzima desoxinucleotidil transferasa terminal
TPT	Tiempo hasta el primer tratamiento
U-LLC	Paciente LLC no mutado para IGVH
UMI	Unique Molecular Identifier
VAF	Frecuencia alélica de la variante
WGS	Secuenciación del genoma completo
WW	Watch and wait

Lista de tablas

Tabla 1.1 Clasificación preliminar de la OMS (5ª edición)	23
Tabla 1.2 Criterios diagnósticos para LBM, LLC y LLC.	27
Tabla 1.3 Características clínicas y biológicas de los subsets mayoritarios en LLC.....	32
Tabla 1.4 Factores de riesgo de los modelos pronóstico clásicos o sistemas de estadificación	35
Tabla 1.5 Índice pronóstico LLC-IPI.....	36
Tabla 1.6 Recomendaciones para la valoración de respuesta tras tratamiento.....	42
Tabla 1.7 Metodología aplicable para la evaluación de EMR	43
Tabla 3.1 Distribución y características de los genes incluidos en cada uno de los paneles a estudio.	59
Tabla 3.2 Distribución y características de los genes BTK y PLC γ 2 incluidos en el panel IBR-R.....	59
Tabla 3.3 Reactivos PCR selectiva Multiplex y condiciones de amplificación Panel IBR-R.	60
Tabla 3.4 Reactivos PCR2 y condiciones de amplificación.....	61
Tabla 3.5 Muestras control para la validación del panel IBR-R.....	65
Tabla 3.6 Reactivos y condiciones para la amplificación por PCR de IGVH.....	66
Tabla 3.7 Reactivos para la purificación y secuenciación del reordenamiento IGVH.....	66
Tabla 4.1 Principales características clínicas y biológicas de 96 pacientes con LLC a estudio..	74
Tabla 4.2 Cobertura mínima y media total de cada gen a estudio.	73
Tabla 4.3 Porcentaje de casos con una cobertura media por panel de $\geq 1000x$, $\geq 500x$, $\geq 250x$ y $< 100x$	73
Tabla 4.4 Listado de dobles reordenamientos detectados por NGS y no por Sseq.	75
Tabla 4.5 Variables moleculares e Índice pronóstico LLC-IPI de la serie a estudio.....	83
Tabla 4.6 Análisis univariante y multivariante.....	84
Tabla 4.7 Características moleculares de la serie a estudio según la primera línea de tratamiento recibida.....	86
Tabla 4.8 Exactitud del método de análisis.	87
Tabla 4.9 Precisión del método de análisis: Repetibilidad.	88
Tabla 4.10 Precisión del método de análisis: Reproducibilidad.	88
Tabla 4.11 Cobertura mínima y media total de las muestras de seguimiento para cada gen a estudio.	90
Tabla 4.12 Porcentaje de muestras de seguimiento con una cobertura media por panel de $\geq 1000x$, $\geq 500x$, $\geq 250x$ y $< 100x$	90
Tabla 4.13 Análisis univariante y multivariante. Supervivencia libre de progresión.....	94
Tabla 4.14 Análisis univariante y multivariante Supervivencia libre de progresión EMR.	95
Tabla 4.15 Análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) en función del tratamiento en primera línea	105

Lista de figuras

Figura 1.1 Modelos de evolución de la hematopoyesis..	19
Figura 1.2 Descripción general del desarrollo de células B.....	21
Figura 1.3 Origen celular de los linfomas de células B asociado con las etapas del desarrollo de los linfocitos B.	24
Figura 1.4 Cascadas de señalización de la célula B.	26
Figura 1.5 Reordenamiento de las IG durante la ontogenia del linfocito B.....	31
Figura 1.6 Comportamiento clínico de pacientes U-LLC y M-LLC.....	31
Figura 1.7 Curvas Kaplan-Meier de tiempo hasta el primer tratamiento TPT.....	36
Figura 1.8 Dianas terapéuticas en la LLC.	37
Figura 1.9 Resumen de los genes implicados en las vías de señalización y patogenia de la LLC.	41
Figura 1.10 Patrones de evolución clonal.	47
Figura 1.11 Dinámica de crecimiento en la LLC.	48
Figura 3.1 Flujo de trabajo seguido para el estudio del perfil genético por NGS.	58
Figura 3.2 Esquema de PCR para la amplificación de las regiones de interés.	60
Figura 3.3 Esquema de incorporación de las secuencias identificadoras de los productos de la PCR1.	61
Figura 3.4 Resumen del proceso de secuenciación del sistema Miseq de Illumina	62
Figura 3.5 Esquema del flujo de trabajo bioinformático para el procesamiento de los datos obtenidos por NGS Miseq.	63
Figura 3.6 Locus IGVH: localización de los cebadores complementarios a las regiones Leader, FR1 y JH.....	66
Figura 3.7 Esquema de PCR para la amplificación de IGVH por NGS.	67
Figura 4.1 Comparación entre el porcentaje de identidad (homología %) de IGVH detectada por Sseq y NGS, y la proporción de células LLC en base al clonotipo por NGS.....	77
Figura 4.2 Clasificación de las variantes reportadas según su frecuencia alélica de la variante (VAF%) y significado clínico.	77
Figura 4.3 Clasificación de las variantes reportadas según su frecuencia alélica de la variante (VAF%) en clonales, subclonales de alta carga y subclonales de baja carga.....	78
Figura 4.4 Número de mutaciones encontradas en la serie de pacientes global.	79
Figura 4.5 Incidencia y distribución de mutaciones en los 11 genes y marcadores genéticos analizados en la cohorte.	82
Figura 4.6 Curvas de Kaplan-Meier de características clínicas y moleculares con un tiempo hasta el primer tratamiento (TPT).	85
Figura 4.7 Electroforesis capilar tras la optimización del método de preparación de librerías IBR-R.	87
Figura 4.8 Representación de los valores CV (%) en función del número de lecturas de secuenciación.....	89
Figura 4.9 Comparación del número de mutaciones detectadas (incluidas deleciones e inserciones) en la muestra previa y postratamiento, del grupo de pacientes en RC y en recaída a la IQT.....	91
Figura 4.10 Variación del perfil genético en la recaída..	92
Figura 4.11 Dinámica clonal de las mutaciones detectadas bajo tratamiento con IQT en pacientes sin tratamiento previo.....	93

Figura 4.12 <i>Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión para pacientes tratados con IQT como primera línea de tratamiento.</i>	94
Figura 4.13 <i>Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión y supervivencia global según el estado de EMR postratamiento.</i>	96
Figura 4.14 <i>Cinética específica del genotipo y progresión de la enfermedad durante el tratamiento con Ibrutinib.</i>	97
Figura 4.15 <i>Variación del perfil genético en el seguimiento con Ibrutinib.</i>	97
Figura 4.16 <i>Cambio en RLA durante el tratamiento con Ibrutinib según las características del paciente antes del tratamiento.</i>	99
Figura 4.17 <i>Cinética diferencial en el cambio del RLA durante el tratamiento con Ibrutinib.</i> ..	99
Figura 4.18 <i>Patrón de evolución lineal.</i>	101
Figura 4.19 <i>Patrón de evolución ramificada, caso LLC-91.</i>	101
Figura 4.20 <i>Evaluación de EMR en SP a distintos tiempos en la cohorte de pacientes tratados con Ibrutinib</i>	102
Figura 4.21 <i>Supervivencia global en función de la profundidad de respuesta alcanzada en la cohorte de pacientes tratados con Ibrutinib.</i>	102
Figura 4.22 <i>Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión y supervivencia global entre todos los pacientes tratados con Ibrutinib e IQT como primera línea de tratamiento.</i> ..	104
Figura 4.23 <i>Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión entre todos los pacientes tratados con Ibrutinib e IQT al evaluar la EMR por citometría de flujo.</i>	105
Figura 4.24 <i>Seguimiento clonotípico por NGS.</i>	107
Figura 4.25 <i>Distribución clonal de los diferentes reordenamientos IGVH al evaluar la EMR por NGS.</i>	108
Figura 4.26 <i>Comparación EMR (%) por CF y NGS.</i>	108
Figura 4.27 <i>Patrones de evolución clonal.</i>	111
Figura 4.28 <i>Disección de la evolución clonal mediante el perfil mutacional temporal en pacientes tratados en primera línea con IQT.</i>	112
Figura 4.29 <i>Evolución clonal y resistencia a Ibrutinib.</i>	113

Resumen

LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA, EVOLUCIÓN CLONAL Y MONITORIZACIÓN MOLECULAR

Actualmente la estratificación pronóstica de los pacientes con Leucemia Linfática Crónica (LLC) se basa en el índice pronóstico LLC-IPI, que integra marcadores clínicos, citogenéticos y biológicos, principalmente el estudio de la región variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGVH) y el estado mutacional del gen *TP53*. Durante los últimos 10 años, se han hecho importantes avances en la comprensión de la biología de la LLC. Exhaustivos estudios mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), han diseccionado las características genómicas, epigenómicas y transcriptómicas de la enfermedad y han permitido identificar las alteraciones genéticas más comunes asociadas con el desarrollo, la progresión y la resistencia a los tratamientos convencionales, y desarrollar nuevas herramientas pronósticas, y novedosas terapias dirigidas. Aun así, la LLC ilustra el desafío que la evolución del cáncer plantea a la oncología moderna: a pesar de las terapias altamente efectivas, la leucemia evoluciona y puede reaparecer, a corto o largo plazo. De hecho, en el contexto de la inmunoterapia (IQT), la evolución clonal después de la terapia es la regla y no la excepción, mientras que, a pesar del alto nivel de efectividad clínica de las terapias dirigidas (TD), la progresión de la enfermedad con Ibrutinib se aprecia como el resultado de la adaptación del tumor a la resistencia a la terapia.

A día de hoy, se desconoce en qué medida los parámetros clínicos y las alteraciones clonales impactan sobre la evolución de la enfermedad, y si su estudio puede guiar las decisiones terapéuticas. A fin de profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la LLC, el objetivo principal de esta tesis ha sido analizar el impacto en la evolución clonal de las variables clínicas, biológicas y moleculares con valor pronóstico y/o predictivo potencial en la LLC.

Para ello, se realizó un estudio observacional retrospectivo en el que se incluyeron un total de 96 pacientes diagnosticados de LLC/LLCP entre 1999 y 2020 no tratados, de los que se describieron las principales características clínicas y biológicas de la enfermedad, así como las fechas de progresión, administración de tratamiento, y respuesta al mismo. Se caracterizó en la muestra basal y en 302 muestras de seguimiento, el estado mutacional de *TP53*, *SF3B1*, *BIRC3*, *NOTCH1*, *MYD88*, *XPO1*, *EGR2*, *POT1*, *NFKBIE*, *ATM* y *FBXW7*, con 4 paneles independientes, OG-CLL, OG-CLL2, OG-TP53 y OG-ATM, de tecnología *paired-end* 150x2 de lectura corta de Illumina mediante secuenciación de nueva generación (NGS). Se determinó el clonotipo y estado mutacional IGVH por Secuenciación Sanger (Sseq), y en paralelo por NGS a partir de una estrategia de preparación de librerías y una herramienta de análisis B-MyRepCLL propia. Se diseñó y validó el panel IBR-R por un procedimiento de lectura corta y sistemas

Ilumina NGS, para la detección de mutaciones en los genes *BTK* y *PLCγ2* asociados a resistencias a Ibrutinib. La evaluación de la enfermedad medible residual (EMR) por citometría de flujo, se realizó en muestras de SP con la combinación de 8 colores y los marcadores celulares CD19, CD20, CD5, CD43, CD79b, CD81 y CD3 en un FACSCanto II Becton-Dickinson Biociences.

Los resultados muestran la importancia de la caracterización genética en el estadio inicial de la enfermedad por la técnica de NGS expuesta. Conocer el patrón genético, ha permitido evaluar la fracción alélica secuencial de cada mutación como indicador de la capacidad evolutiva de la enfermedad a corto y largo plazo, siendo el fundamento de la asociación potencial entre una dinámica clonal temprana y una respuesta adversa a según qué tipo de tratamiento administrado y en función del tiempo. En concreto, las mutaciones secuencialmente adquiridas en los genes *TP53* y *SF3B1*, y la del(17p13), han revelado el patrón de evolución más relacionado con el mecanismo de resistencia molecular a la IQT, mientras que el aumento de carga, en el contexto de la terapia con Ibrutinib, se ha asociado a otros genes *driver*, como *SF3B1* y *NOTCH1*, y con una relación indirecta entre *TP53*_{mut} y la competencia clonal. Además, la implementación del panel IBR-R, ha permitido detectar la mutación en el gen *BTK* p.Cys481Ser meses antes de la recaída clínica, lo que refuerza el papel de estas mutaciones como elementos centrales de la resistencia a Ibrutinib.

El método desarrollado de preparación de librerías *in house* del locus IGH por NGS y la herramienta específica B-MyRepCLL, ha demostrado ser altamente robusto en la anotación de los reordenamientos VDJ y en la detección del repertorio inmunogenético, con respecto a la técnica *gold-estándar* en la actualidad, la Sseq. Este avance en la inmunogenética ha servido para detectar la enfermedad medible residual con mayor sensibilidad y rastrear las poblaciones de células B clonales, su dinámica y características moleculares.

Introducción

1 Introducción

La hematopoyesis es el proceso dinámico mediante el cual el organismo obtiene el repertorio completo de células sanguíneas a partir de células progenitoras multipotentes, las células madre hematopoyéticas (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC) (Rodrigues et al., 2020).

La capacidad de autorrenovación y diferenciación en múltiples linajes de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea (MO), hace posible la producción permanente de todas las células sanguíneas. Los avances en genómica, la secuenciación de nueva generación (*Next-Generation Sequencing*, NGS) y los mapeos integrados de célula única o *single-cells*, han revelado que la hematopoyesis más que un proceso jerárquico como se pensaba originalmente (Orkin & Zon, 2008), es un proceso continuo y menos unilineal (Figura 1.1) (Liggett & Sankaran, 2020; Buenrostro et al., 2018; Jacobsen & Nerlov, 2019).

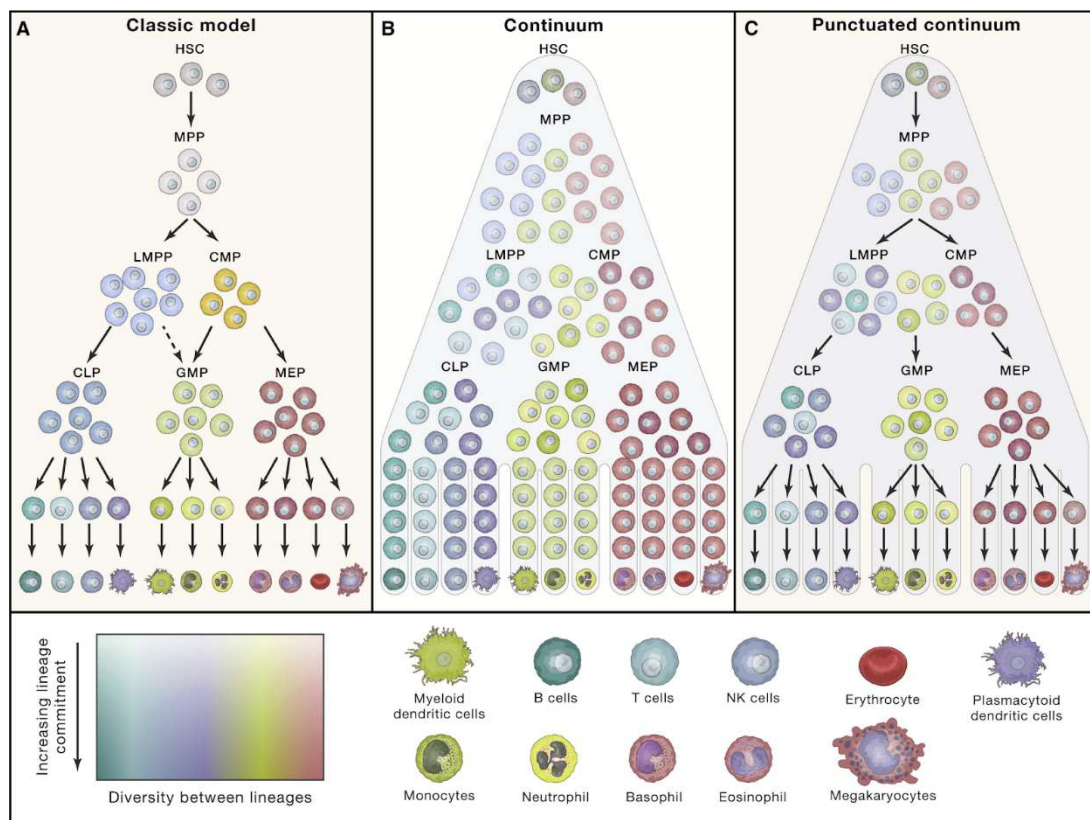


Figura 1.1 Modelos de evolución de la hematopoyesis. A) Modelo clásico; B) Modelo continuo; C) "Punctuated continuum", comparte algunas de las transformaciones fenotípicas del modelo clásico, pero los estados celulares son conjuntos heterogéneos de células (Liggett & Sankaran, 2020).

Las células progenitoras multipotentes (*Multipotent Progenitor Cells*, MPP), descendientes inmediatos de las HSC, tienen potencial de linaje completo pero capacidad limitada para la autorrenovación. Las MPP dan lugar a progenitores oligopotentes: progenitores mieloides comunes

(*Common Myeloid Progenitors*, CMP) y progenitores linfoide-mieloide (*Lymphoid/Myeloid Progenitor*, LMPP) (Doulatov et al., 2010). Los CMP se diferencian en progenitores de granulocitos/macrófagos (*Granulocyte/Macrophage Progenitors*, GMP) y progenitores eritroides/megacariocíticos (*Megakaryocyte/Erythroid Progenitors*, MEP), que dan lugar a progenitores y precursores maduros. Las LMPP son capaces de generar tanto GMP como los progenitores linfoides comunes (*Common Lymphoid Progenitors*, CLP), que se diferencian en precursores de células B, T y NK.

El éxito de este proceso se basa en la interacción sinérgica entre el propio programa de diferenciación codificado genéticamente y una serie de factores intrínsecos y extrínsecos, entre los que se incluye el microambiente, factores de transcripción específicos y estado metabólico intracelular (Rodrigues et al., 2020).

La pérdida de homeostasis en la autorrenovación y diferenciación de las HSC, junto con una proliferación incontrolada de las células progenitoras derivadas, promueve la expansión clonal del sistema hematopoyético y el origen de la leucemogénesis y linfomagénesis (Kennedy & Barabé, 2008; Warner et al., 2004). La transformación maligna implica la adquisición de una serie de cambios genéticos y epigenéticos que subvierten los programas normales de desarrollo celular, generando un clon neoplásico con propiedades de crecimiento desregulado (Ramos & Martins, 2021).

1.1 Linfopoyesis: desarrollo de los linfocitos B.

La linfopoyesis es el proceso de formación y maduración de la serie linfoide, a partir de células progenitoras CLP. Los órganos linfoides primarios, o centrales son: el timo, donde tiene lugar el desarrollo de los linfocitos; y la MO, donde ocurre lo equivalente para linfocitos o células B (Zehentmeier & Pereira, 2019).

El desarrollo de los linfocitos B es complejo e implica varios pasos de diferenciación controlados por una serie de factores de transcripción que interactúan con el microambiente celular. En MO, los primeros estadios del desarrollo de las células B, se caracterizan por el reordenamiento de los loci de la cadena pesada (*Heavy*, H) y cadena ligera (*Light*, L) de las inmunoglobulinas, (IGH e IGL, respectivamente), por el proceso conocido como recombinación genética. Es un mecanismo aleatorio, en el que se seleccionan y ensamblan regiones génicas para conformar una inmunoglobulina exclusiva y única. Esta estructura queda anclada en la membrana de la célula B (inmunoglobulina de membrana, mIg), constituyendo el componente esencial del receptor transmembrana de la célula B (*B-cell receptor*, BCR). El receptor BCR juega un papel clave en el desarrollo de la célula B, e interviene en la respuesta inmune adaptativa, de la mano de su capacidad de reconocimiento antigénico (Figura 1.2) (Burger & Wiestner, 2018a).

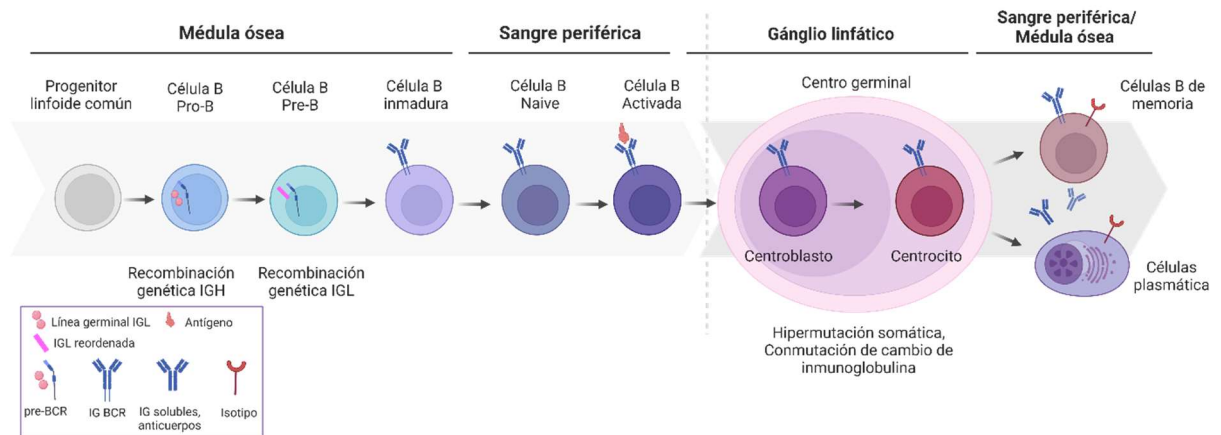


Figura 1.2 Descripción general del desarrollo de células B. Orden cronológico de los estadios de células B en la médula ósea (izquierda) y los órganos linfoides secundarios (derecha). Se representa el paso específico en el que se produce cada reordenamiento del gen de la inmunoglobulina (Adaptada de las plantillas de BioRender.com).

Durante la diferenciación de las CLP en células pro-B, tiene lugar también el reordenamiento gradual de los segmentos génicos que expresan la cadena IGH precursora, y su asociación con una molécula similar a IGL (*Surrogate Light Chain, SLC*), para conformar el receptor pre-B (*pre-B cell receptor, pre-BCR*) (Smith & Roman, 2010). La expresión de pre-BCR inicia la progresión hacia las etapas de células pre-B e induce el reordenamiento completo de la cadena IGL. La adquisición de un BCR funcional, compuesto por la combinación única de IGH e IGL para la conformación de la inmunoglobulina (IG), distingue a las células B inmaduras de sus precursores de células pre-B, y es en este punto donde los precursores de linfocitos B han alcanzado la etapa final del desarrollo independiente de antígeno (Burger & Wiestner, 2018; Eibel et al., 2014; Nemazee, 2017; Surova & Jumaa, 2014).

En esta etapa, el BCR tiene ya capacidad de reconocimiento antigénico, y los antígenos (Ag) con los que intercatúa en el microambiente de la MO, son casi siempre autoantígenos (galectina-1). Resulta imprescindible alcanzar la especificidad y evitar la autorreactividad, es por ello que los linfocitos B se someten a varios puntos de control durante la linfopoyesis para determinar su nivel de autorreactividad, proceso conocido como tolerancia central, y mediada por mecanismos de anergia, e inducción de apoptosis celular (Melchers, 2015; Winkler & Mårtensson, 2018).

Los linfocitos B naïve, con un BCR inocuo, salen de la MO y completan su maduración en la periferia, donde la diferenciación en los diversos subconjuntos de células B (células B del manto folicular, de la zona marginal, y del centro germinal) está determinada por las distintas influencias microambientales de los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide) (Rickert, 2013). La gran mayoría de las células B inmaduras, recirculan a través de la sangre y las regiones foliculares de los órganos linfoides, hasta el reconocimiento de un Ag afín. Estos linfocitos B activados, migran a los órganos linfoides secundarios, donde se desarrollan por un proceso dependiente o independiente del centro germinal, en respuesta al encuentro con el Ag (De Silva & Klein, 2015).

Los centros germinales (*Germinal Centers*, GCs) se localizan dentro de los folículos de los órganos linfoides secundarios. Son estructuras microanatómicas formadas por acúmulos de células B activadas, denominadas centroblastos, con alta capacidad proliferativa. Los centroblastos, tienen una afinidad por el Ag que adquieren a través de una segunda ronda de diversificación de los genes de las inmunoglobulinas, impulsada por dos procesos simultáneos: la hipermutación somática (*Somatic Hypermutation*, SHM), y la conmutación de cambio de inmunoglobulina (*Class-Switch Recombination*, CSR). La proliferación dependiente de afinidad, selecciona positivamente los ahora centrocitos, caracterizados por un BCR de alta afinidad antigénica, para dar lugar a células B de memoria y células plasmáticas. Las primeras, circulan por todo el organismo en busca de la neutralización de los Ags por los que sus BCRs tienen alta afinidad. En cambio, las células plasmáticas, secretan anticuerpos específicos (Ab, o también conocidos como inmunoglobulinas solubles, sIg), y migran a la MO, donde pueden residir indefinidamente (Nakagawa & Calado, 2021; Vitoria & Nussenzweig, 2022).

Los linfocitos B de la zona marginal, presentes en el bazo y algunos tejidos linfoides, a menudo expresan BCR con baja afinidad, polireactivos, y pueden responder rápidamente a los antígenos microbianos; mientras que las células B del manto, son linfocitos B de menor tamaño, e inactivos, que se extienden como un manto en torno al centro germinal, y presentan un bajo índice proliferativo (Kersy et al., 2021; Rossi et al., 2022).

BCR es una molécula de supervivencia clave en la ontogenia del linfocito B normal, dado que incluso en ausencia de estimulación antigénica, la señalización basal (o tónica) de BCR es indispensable, pero también lo es para la mayoría de las neoplasias malignas de células B puesto que las mutaciones que acompañan a la transformación de células B malignas a menudo afectan a la red de señalización de BCR (Reed, 2022; Shaffer et al., 2012).

1.1.1 Neoplasias de linfocitos B maduros: Linfomas no Hodgkin.

Las neoplasias de células B, por lo general, conservan las características clave de su célula de origen, incluidas las específicas de la etapa de diferenciación del precursor de la neoplasia hematológica (Küppers, 2005).

El término leucemia se refiere a la expansión clonal de células malignas en médula ósea, lo que clásicamente resulta en un número elevado de células del linaje afectado, en la sangre circulante y, en ciertas neoplasias linfoides, la proliferación celular anormal en el tejido linfático. Generalmente se clasifican en dos tipos según el linaje, linfóide o mielóide, y el estado de maduración celular, agudo o crónico.

Los linfomas son neoplasias de linfocitos B y T bien diferenciados, que típicamente se presentan como masas malignas en el tejido linfático. Las neoplasias linfoides maduras, se clasifican en tres grupos: neoplasias de células B maduras, neoplasias de células T o natural killer (NK) maduras, o linfomas Hodgkin (*Hodgkin's Lymphoma*, HL). Colectivamente, los linfomas no Hodgkin (*Non-Hodgkin's Lymphomas*, NHLs), un grupo heterogéneo de más de 60 subtipos, abarcan las neoplasias de células B y T/NK (Tabla 1.1) (Alaggio et al., 2022; Bispo et al., 2020).

Neoplasias de células B maduras
Proliferaciones pre-neoplásicas o neoplásicas de linfocito pequeño
Linfocitosis B monoclonal
Leucemia linfocítica crónica/ Linfoma Linfocítico de célula pequeña
Leucemias y linfomas de células B esplénica
Linfoma linfoplasmocítico
Linfoma de la zona marginal
Linfoma Folicular
Linfoma cutáneo centrofolicular
Linfoma de células del manto
Transformación de linfomas de células B indolente
Linfomas B de células grandes
Linfoma Burkitt
Linfomas y proliferaciones linfoides de células B asociadas a KSHV/HHV-8
Linfomas y proliferaciones linfoides asociadas con inmunodeficiencia y desregulación
Linfoma de Hodgkin

Tabla 1.1 Clasificación preliminar de la OMS (5ª edición) (Alaggio et al., 2022).

La mayoría de los linfomas no Hodgkin de células B (*B cell Non-Hodgkin's Lymphomas*, B-NHL) se desarrollan a partir de células B maduras del GC o que han pasado por el GC. La inestabilidad genómica asociada con los procesos de SHM y CSR durante el tránsito de GC, aumenta la susceptibilidad a la transformación maligna.

En el caso de la leucemia linfocítica crónica (LLC), el origen celular es controvertido: la presencia de reordenamientos clonales de IG, junto con la expresión de marcadores de superficie celular específicos, sugiere que la LLC deriva de una célula B madura que se caracteriza por una expresión débil de marcadores de células B, aunque no está claro si los linfocitos B LLC son pre-GC o post-GC (Figura 1.3) (Bosch & Dalla-Favera, 2019; Küppers, 2005).

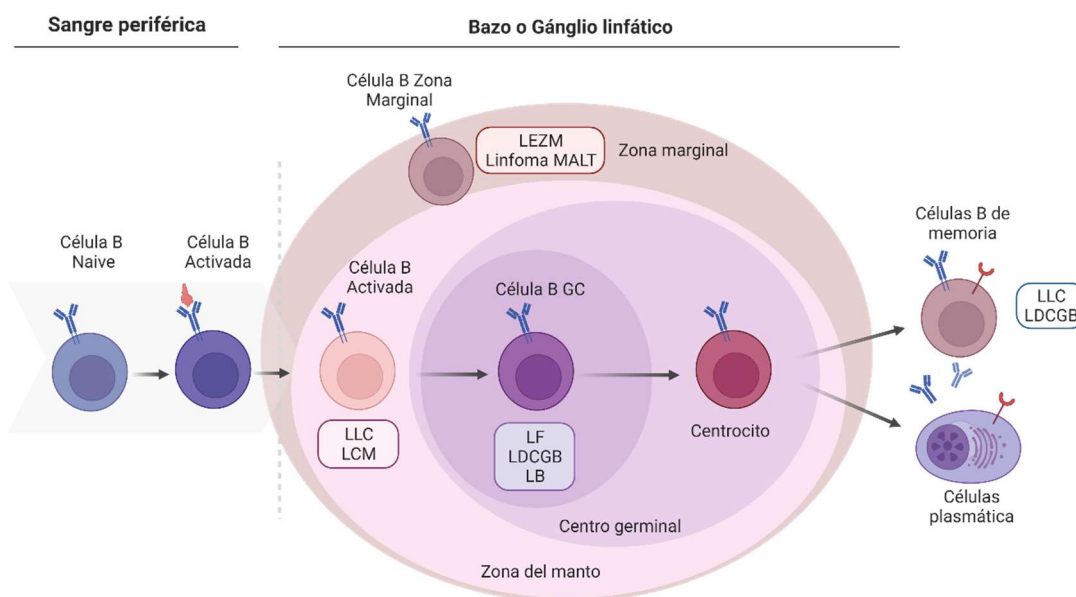


Figura 1.3 Origen celular de los linfomas de células B asociado con las etapas del desarrollo de los linfocitos B. LLC: Leucemia Linfocítica Crónica; LCM: Linfoma de células del manto; LEZM: Linfoma esplénico de la zona marginal; LF: Linfoma folicular; LDCGB: Linfoma difuso de células grandes B; LB: linfoma de Burkitt; Linfoma MALT: Linfoma de la zona marginal extranodal del tejido linfoide asociado a mucosas. (Adaptada de las plantillas de BioRender.com).

1.1.2 Señalización mediada por BCR en los linfocitos B: activación crónica en neoplasias linfoides.

Como se ha mencionado, la señalización a través del BCR es fundamental para el desarrollo y mantenimiento de las células B. A la luz de las numerosas vías proliferativas y de supervivencia activadas a partir del BCR, no sorprende que las células B malignas involucren a este receptor para promover su crecimiento y supervivencia (R. M. Young & Staudt, 2013).

El BCR está formado por una inmunoglobulina de membrana unida de forma no covalente a un heterodímero compuesto por $CD79\alpha$ (*protein- α* , *Ig α*) y $CD79\beta$ (*protein- β* , *Ig β*). Además, está asociado a correceptores que regulan positivamente la señal a través de CD21, CD19 y CD81; y a correceptores negativos o inhibidores de señal, el receptor Fc de la Ig (FcRIIB) y la molécula CD22.

A través del BCR, se generan dos tipos de señales: una señal continua basal denominada 'tónica', independiente de la unión al antígeno; y una señalización "crónica" en respuesta al reconocimiento antigénico. Estas señales, promueven la selección, proliferación y supervivencia de las células B a través de distintas vías de activación: MAPK, NFAT, AKT/mTOR, NF- κ B y BCL-2 (ten Hacken & Burger, 2014).

El BCR está conectado a una red de quinasas y fosfatasa que regulan y amplifican su activación. La activación de BCR dependiente de antígeno, comienza a través de la fosforilación de los motivos de activación basados en inmunorreceptores de tirosina (*tyrosine-based activation motifs*, ITAMs) de $CD79\alpha$ y $CD79\beta$, por la acción de tirosin quinasas de la familia Src, entre las que se encuentran LYN, FYN y BLK.

Estos eventos, están asociados con la oligomerización y el crecimiento en microclusters de BCR, lo que promueve el reclutamiento y activación de otras quinasas, en concreto SYK (*Spleen Tyrosine Kinase*). Por un lado, SYK induce la fosforilación de RAS, que se une y activa la quinasa RAF, para que, posteriormente active MEK1 y MEK2, localizados inmediatamente a continuación de la quinasa relacionada con la señal extracelular (ERK)1/2 (Muzio et al., 2008).

Por otro lado, la activación de SYK, induce la de la proteína enlazadora de células B (B cell linker protein, BLNK), de la tirosina quinasa de Bruton (*Bruton Tyrosine Kinase*, BTK) y de la fosfolipasa $\text{C}\gamma 2$ (*PhosphoLipase C $\gamma 2$* , PLC $\gamma 2$). BLNK permite que SYK fosforile BTK, aunque en el reclutamiento de BTK, también participa de manera paralela la señalización tónica de BCR (Burger & Wiestner, 2018).

En la señalización tónica de BCR, el correceptor positivo CD19 participa en la activación de la vía PI3K-AKT y a la inducción de la supervivencia. Tras la fosforilación de los dominios citoplasmáticos de CD19 por LYN, la enzima fosfoinosítido 3-quinasa (*Phosphoinositide 3-kinase*, PI3K), es reclutada y activada, para generar una molécula lipídica que actúa como segundo mensajero, la fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (*Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphate*, PIP3), a partir de la fosforilación del fosfolípido de membrana PIP2 (*Phosphatidylinositol-4,5-bisPhosphate*). PIP3, es esencial para el reclutamiento de BTK y la activación de PLC $\gamma 2$ (Burger & Wiestner, 2018; Hus et al., 2022).

La activación de PLC $\gamma 2$, hidroliza PIP2 para generar inositol trifosfato (*Inositol trisPhosphate*, IP3) y diacilglicerol (*DiAcylGlycerol*, DAG). La unión de IP3 a su receptor, un canal de calcio localizado en el retículo endoplasmático (RE), inicia la movilización del calcio (Ca^{2+}) al citosol celular.

El Ca^{2+} por un lado, activa la fosfatasa calcineurina (CN), la cual defosforila y activa el factor de transcripción NFAT (nuclear factor of activated T cells); la acción conjunta del Ca^{2+} y DAG, activan la proteína quinasa $\text{C}\beta$ (*Protein Kinase C*, PKC β), la cual fosforila el adaptador de la proteína CARD11 (*caspase recruitment domain-containing protein 11*) para la activación del factor nuclear- κB (*Nuclear Factor- κB* , NF- κB); por último, los niveles Ca^{2+} regulan la apoptosis celular (Figura 1.4) (Debant et al., 2015).

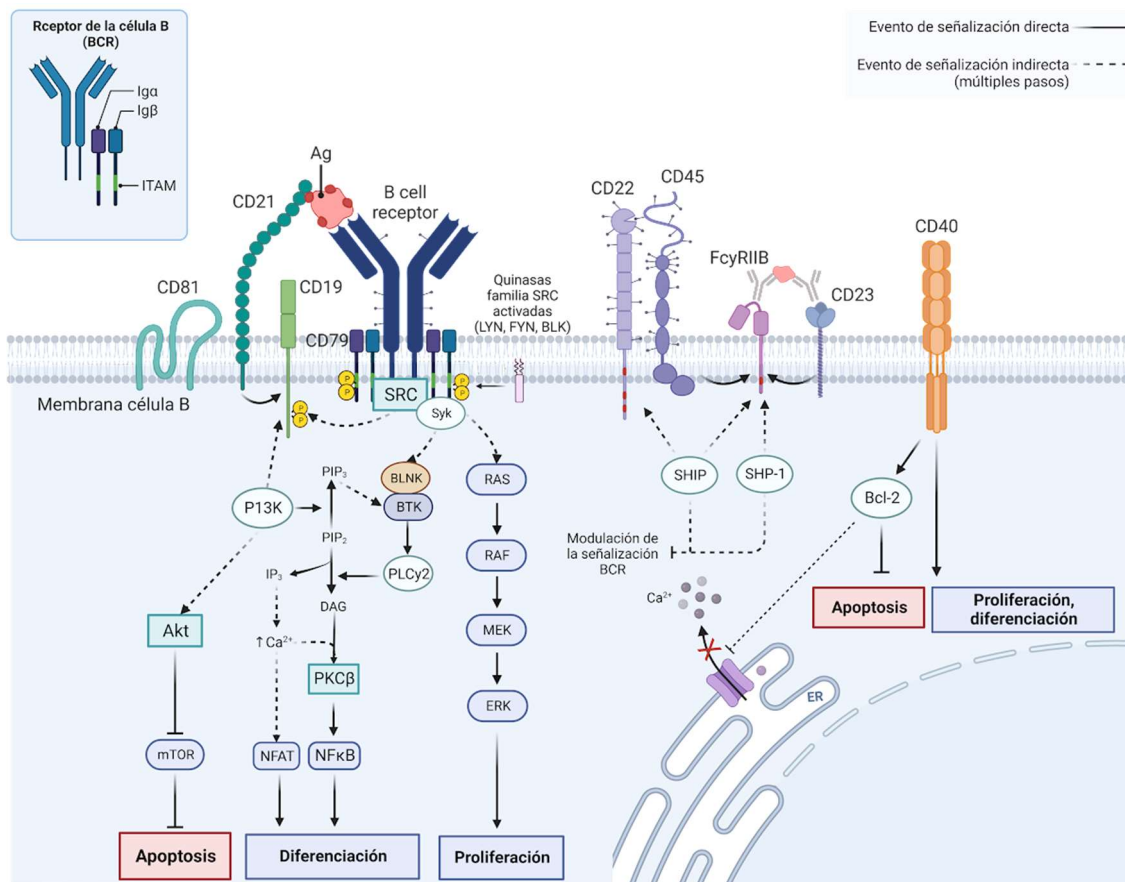


Figura 1.4 Cascadas de señalización de la célula B. Maquinaria de señalización celular a través de la activación antigénica del receptor BCR, para promover el propio crecimiento, diferenciación, proliferación y supervivencia de la población linfocitaria B. (Adaptada de las plantillas de BioRender.com).

La apoptosis, es el proceso de muerte celular programada. Durante la activación del linfocito B, la proteína anti-apoptótica BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) tiene un papel determinante en la consolidación de la supervivencia celular. BCL-2, actúa en dos compartimentos celulares diferentes, la mitocondria y el RE. El mecanismo más descrito de BCL-2 es su acción sobre sus heterólogos, las moléculas proapoptóticas como BAX (*Bcl-2-associated X protein*), localizadas en la mitocondria. La inhibición de la apoptosis por BCL-2 también es mediada en el RE, a través de la inhibición de la actividad del receptor de IP3. Esta inhibición, limita la liberación de Ca²⁺ al citosol, promoviendo la proliferación mientras que es insuficiente para desencadenar la apoptosis (Figura 1.4) (Ferrer & Montserrat, 2018).

En el caso de la LLC, se han descrito numerosas moléculas propias que actúan como autoantígenos (galectina-1, de las células estromales), así como antígenos externos, de los que las células de LLC son reactivas. Este hallazgo, podría explicar la activación crónica de la vía BCR, evidencia que se ve particularmente en las células de LLC aisladas de los ganglios linfáticos, las cuales normalmente muestran altos niveles de expresión de genes diana de BCR y NF-κB y expresan moléculas de señalización de BCR activados constitutivamente, incluido LYN, SYK, PI3K y BTK entre otras. Es importante destacar que la activación aumentada de estas moléculas se correlaciona con la inhibición

de la apoptosis espontánea, lo que sugiere un papel favorable en la supervivencia de las señales BCR (Efremov et al., 2020).

1.2 Leucemia Linfática Crónica (LLC).

1.2.1 Características de la LLC: definición y criterios diagnósticos.

La leucemia linfocítica crónica (LLC), es una neoplasia de célula B madura que se caracteriza por la proliferación y acumulación de linfocitos B monoclonales en sangre periférica (SP), MO, tejidos linfoides, y/o áreas extraganglionares. Como consecuencia cursa con linfocitosis, infiltración de células leucémicas en la médula, linfadenopatías y organomegalias (Alaggio et al., 2022).

Es la leucemia en adultos más común en los países occidentales, si bien, es menos frecuente en Asia y relativamente rara en Japón y Corea, lo que sugiere la implicación de factores genéticos ligados a la raza (Hallek & Al-Sawaf, 2021; Kipps et al., 2017).

Con una incidencia de 4,7 casos por cada 100.000 habitantes por año, representa el 1,1% de todos los cánceres en EEUU (estadísticas de “The Surveillance E, and End Results (SEER) Program of the National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Leukemia—Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), 2022”). El riesgo de padecer LLC, es aproximadamente dos veces mayor en hombres que en mujeres (6,4 per 100,000 hombres; 3,4 per 100,000 mujeres), y la prevalencia es superior en zonas donde la población está más envejecida, con una mediana de edad al diagnóstico de 70 años (Eichhorst et al., 2021; Chiorazzi et al., 2021).

La LLC se diagnostica por la presencia de $>5 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales en SP durante al menos 3 meses; o por la presencia de su variante no leucémica, el linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP). El desarrollo de la LLC a menudo está precedido por un estado precursor no sintomático llamado linfocitosis de células B monoclonales (LBM), definido como un recuento de células B monoclonales $<5 \times 10^9/L$ con el fenotipo típico de LLC (Tabla 1.2) (Alaggio et al., 2022).

Característica	LBM	LLCP	LLC
Recuento células B clonales	$<5 \times 10^9/L$	$<5 \times 10^9/L$	$>5 \times 10^9/L$
Linfoadenopatías/Organomegalia	-	+	-/+
Citopenia	-	-	-/+

Tabla 1.2 Criterios diagnósticos para LBM, LLCP y LLC. Linfocitosis de células B monoclonales (LBM), linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP), leucemia linfática crónica (LLC) (Adaptación de Alaggio et al., 2022).

Aproximadamente, el 50-70% de los pacientes con LLC se diagnostican de forma accidental, al detectar una linfocitosis absoluta en el hemograma. En ocasiones, se acompaña de síntomas B (fiebre, sudores nocturnos o pérdida de peso) (Eek et al., 2021; Tresckow et al., 2019). La linfoadenopatía es el hallazgo más común en la exploración física, detectándose en el 70-80% de los casos. Un 50% de los

pacientes presentan organomegalias, de las que la esplenomegalia varía de ser apenas palpable a masiva, mientras que la hepatomegalia es menos frecuente.

La enfermedad resulta de la acumulación de linfocitos neoplásicos pequeños y maduros, que coexpresan marcadores esenciales de superficie o citoplasmáticos CD5, CD19, CD20, CD23 y expresión débil de inmunoglobulinas de superficie (Hallek et al., 2018; Rawstron et al., 2018).

A pesar de esta homogeneidad fenotípica, la evolución clínica y biológica es muy heterogénea: algunos pacientes presentan una enfermedad agresiva que requiere tratamiento poco después del diagnóstico y/o pueden sufrir una transformación histológica a un linfoma agresivo, usualmente linfoma difuso de células grandes (LDCGB), conocido como síndrome de Richter; mientras que otros cursan de forma indolente con supervivencia prolongada (Eichhorst et al., 2021).

1.2.2 **Pronóstico en la LLC: estimación en situaciones de incertidumbre.**

Se denomina factor pronóstico a toda situación, condición o característica que proporciona información prospectiva de la evolución del paciente, independientemente del tratamiento administrado. Generalmente refleja la biología subyacente y la historia natural de la enfermedad (Gaidano & Rossi, 2017; Zenz, Fröhling, et al., 2010b).

1.2.2.1 *Estadaje clínico: estadios de Rai y Binet.*

El sistema de estadificación Rai define: estadio 0, enfermedad de bajo riesgo, en presencia de linfocitosis con células leucémicas en la sangre y/o la médula (células linfoides >30 %); estadio I o II, como enfermedad de riesgo intermedio, con linfocitosis, adenopatías palpables o no en cualquier localización, y esplenomegalia y/o hepatomegalia; enfermedad de alto riesgo, en pacientes con anemia relacionada con la enfermedad (definida por un nivel de hemoglobina (Hb) inferior a 11g/dL) (estadio III) o trombocitopenia (definida por un recuento de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/L$) (estadio IV) (Rai et al., 1975).

De forma similar, el sistema de estadificación de Binet se basa en el número de áreas afectadas, definidas por la presencia de adenopatías de más de 1cm de diámetro u organomegalia, si hay anemia o trombocitopenia. Las áreas de compromiso consideradas son: cabeza y cuello, axilas, ingles, bazo palpable e hígado palpable. El sistema de estadificación Binet define: estadio A, como Hb $\geq 10g/dL$ y plaquetas $\geq 100 \times 10^9/L$ y hasta dos áreas ganglionares involucradas; estadio B, como Hb $\geq 10g/dL$ y plaquetas $\geq 100 \times 10^9/L$ y organomegalia mayor que la definida para el estadio A (tres o más áreas ganglionares); estadio C, como Hb $< 10g/dL$ y/o un recuento de plaquetas de menos de $100 \times 10^9/L$ (Binet et al., 1981).

1.2.2.2 *Beta-2-microglobulina.*

La beta-2 microglobulina (β 2M), es una proteína extracelular que se expresa en células nucleadas y se asocia de forma no covalente con la cadena β del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. En la LLC, se correlaciona con marcadores de proliferación rápida, como la expresión elevada de LDH, CD38 y ZAP70, y con la síntesis de proteínas, pudiendo reflejar la presencia de un clon proliferativo más “activo” (Parikh & Shanafelt, 2016). De hecho, un valor el β 2M elevado ($\geq 3,5$ mg/L) al diagnóstico, se asocia de forma independiente con un menor tiempo hasta el primer tratamiento (*time-to-first-treatment*, TPT) y una menor supervivencia global (*Overall Survival*, SG) (Parikh & Shanafelt, 2016; Thompson, O’Brien, et al., 2016a).

1.2.2.3 *Componentes de BCR.*

Aunque los sistemas de puntuación de Rai y Binet, y los marcadores séricos todavía se usan en la práctica clínica, no son suficientes para dilucidar el pronóstico en el contexto de la heterogeneidad de la LLC. Más recientemente, el desarrollo de nuevas técnicas y la mejora de la caracterización genética y molecular de la LLC, han generado una plétora de biomarcadores pronósticos que han demostrado ser útiles en la estratificación del riesgo del paciente (Hallek & Al-Sawaf, 2021).

1.2.2.3.1 Gen de las inmunoglobulinas: región variable de la cadena pesada de las IG.

La heterogeneidad biológica de la LLC, en parte, se puede atribuir al origen inmunogenético de la enfermedad (Almasri et al., 2022). Parte de la exclusividad del BCR de cada células B, se debe al proceso de recombinación genética que sufren los complejos génicos de IGH e IGL (*Kappa*, IGK o *Lambda*, IGL) durante el desarrollo de las células B en la MO: complejo variable (*Variable*, V), diversidad (*Diversity*, D) y unión (*Joining*, J); VDJ para las cadenas pesadas y VJ para las cadenas ligeras.

En el locus de la IGH, localizado en el cromosoma 14q32.33, es considerablemente más complejo que los grupos de cadenas ligeras. Los aproximadamente 80 segmentos del gen *VH*, se pueden agrupar en 7 familias diferentes de segmentos génicos relacionados, y de estos, aproximadamente 39 son funcionales. Además, hay 27 segmentos del gen *DH* y 6 segmentos del gen *JH* (Figura 1.5A) (Schroeder & Cavacini, 2010).

Este mecanismo de recombinación, es iniciado por dos genes *Rag1* y *Rag2*, cuyos productos actúan sinérgicamente en la unión de los segmentos V, D, J. Las proteínas RAG reconocen secuencias señal de recombinación (*Recombination Signal Sequences*, RSS) que flanquean todas las unidades génicas V, D y J e introducen roturas de doble cadena (*DNA Double-Strand Breaks*, DSBs) en el ADN (ácido desoxirribonucleico), adyacentes a las RSS. La recombinación comienza con la unión de un segmento del gen *DH* a un *JH*, seguido por la yuxtaposición de un elemento *VH* al extremo amino-

terminal del intermediario DJ. De esta manera, las DSBs se reparan mediante la unión de extremos no homólogos. Durante este proceso de corte y empalme, la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*, TdT), agrega nucleótidos aleatorios en las uniones, conocidos como nucleótidos N, aumentando así la diversidad del repertorio de IGH (Soulas-Sprauel et al., 2007).

La conjunción del complejo reordenado V(D)J de la IGH e IGL, conforma el fragmento variable (Fv) del BCR. Las regiones de Fv, que entrarán en contacto estrecho con el Ag, tras el reconocimiento antigénico, son las denominadas regiones determinantes de complementariedad (*Complementarity Determining Regions*, CDR). En concreto, CDR3 de IGH, es el epítipo más hipervariable en longitud y estructura, por ser la región que acumula mayor número de DSBs y de nucleótidos N (Dunn-Walters et al., 2018).

Como se ha mencionado, tras la activación por exposición a un Ag afín del linfocito B, se genera diversidad BCR adicional por el proceso de hipermutación somática (*Somatic Hypermutation*, SHM). En concreto, la enzima deaminasa de citosina inducida por activación (*Activation Induced Cytosine Deaminase*, AID), introduce mutaciones, sobre todo, de nucleótido único, en la región V(D)J a una tasa de 10^{-3} cambios por par de bases por ciclo celular. Estas mutaciones están preferiblemente presentes en las CDR, dando lugar a BCR que se seleccionan para aumentar la capacidad de unión a antígeno en los GC, garantizando así la maduración por afinidad (Figura 1.5 B y C) (Hengeveld et al., 2021).

El paso final de diversificación del gen IG es la conmutación del cambio de inmunoglobulina o CSR también llamado conmutación del isotipo, es un proceso en el que se cambia la región constante de la IGH, modificando así la función de la IG sin alterar su especificidad antigénica (Figura 1.5 B y C) (Soulas-Sprauel et al., 2007).

1.2.2.3.1 [Estado mutacional de IGVH: origen celular y subtipos.](#)

El estado SHM del gen de la región variable de IGH (IGVH), resulta clave en la estratificación del riesgo en la LLC (Sutton et al., 2017). Es una entidad genética única que permanece estable a lo largo de la evolución de la enfermedad, y es independiente de otros parámetros clínicos y biológicos (Baliakas et al., 2015).

Los pacientes con SHM limitado o nulo (no mutado, U-LLC) generalmente muestran una forma agresiva de LLC, con inferior SG y TPT (40% de los casos); mientras que aquellos con una carga de SHM significativa (mutado, M-LLC) siguen un curso más indolente (60%). Sin embargo, los casos con una IGVH3-21 son la excepción, puesto que, independientemente del estado mutacional, presentan una SG similar a la de los casos no mutados (Figura 1.6) (Chiorazzi & Stevenson, 2020; Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999; Tobin et al., 2002).

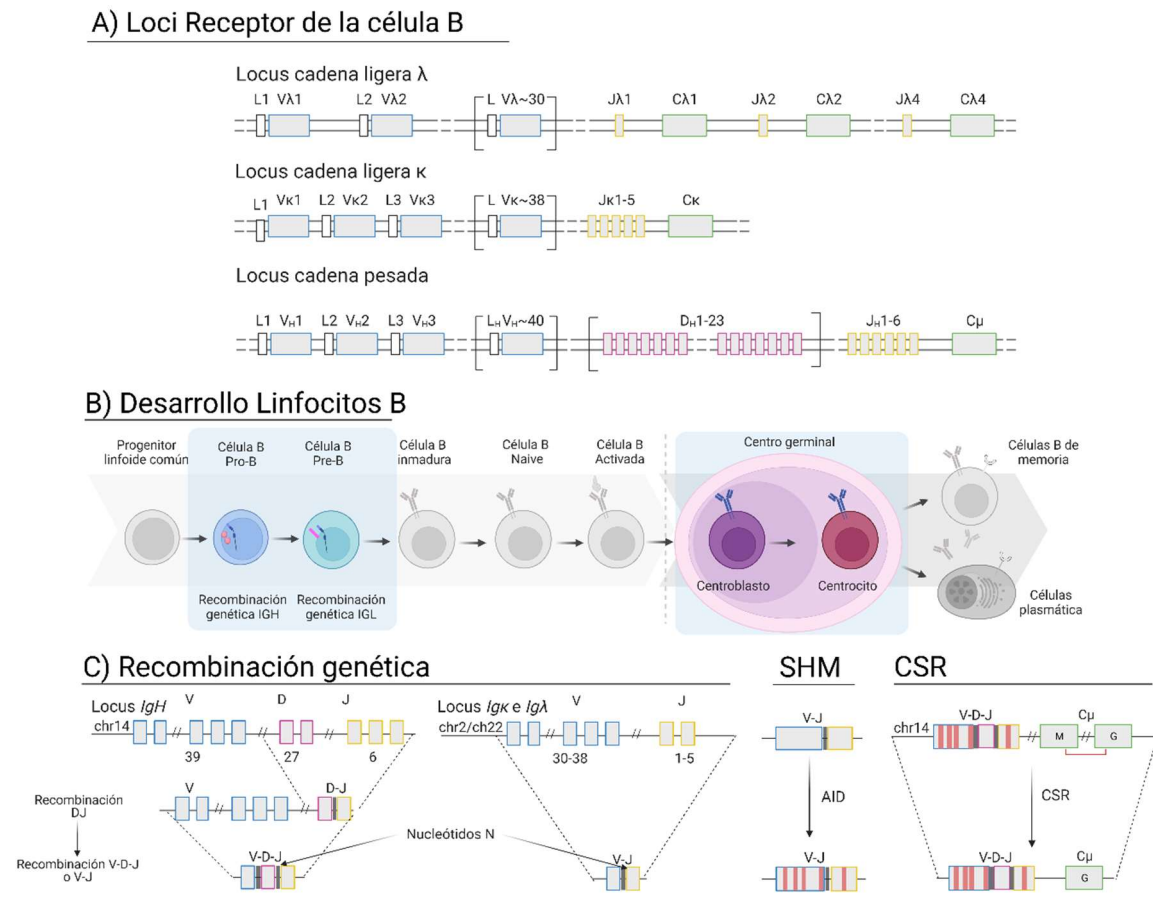


Figura 1.5 Reordenamiento de las IG durante la ontogenia del linfocito B. A) Loci del receptor de la célula B, Locus de la cadena ligera Lambda (λ) y Kappa (κ), cadena pesada (H). B) Durante el desarrollo de la célula B, el proceso de recombinación genética de las IGH e IGL, se produce en estadio pro-B y pre-B, respectivamente, mientras que la SHM y CSR, en los centros germinales. C) Esquema del proceso de recombinación genética, SHM y CSR. L: leader; V: variable; D: diversidad; J: junction o unión; C: constante. SHM: Hipermutación somática; CSR: conmutación del cambio de inmunoglobulina. G: cadena pesada gamma (IgG); M: cadena pesada mu (IgM). (Adaptada de las plantillas de BioRender.com).

Tal y como se subraya en las recomendaciones del grupo ERIC (European Research Initiative on CLL), el valor de cut-off del 98% de similitud u homología con respecto a la línea germinal (reordenamiento en ausencia de SHM), se emplea para estratificar a los pacientes como M-LLC (<98%) o U-LLC (\geq 98%) (Agathangelidis et al., 2022).

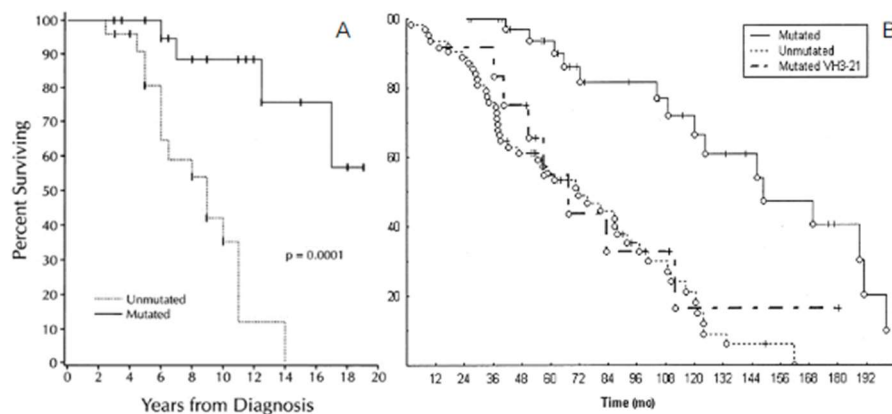


Figura 1.6 Comportamiento clínico de pacientes U-LLC y M-LLC. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) A) Adaptación (Damle et al., 1999) B) SG casos con IGHV3-21 (Tobin et al., 2002).

Estas dos entidades biológicas en la LLC, surgen de linfocitos B en diferentes etapas de maduración: estado mutacional U-LLC, similar al mostrado por las células B inmaduras pre-GC con un repertorio restringido de variabilidad en la IGH; estado mutacional M-LLC, derivado de linfocitos B maduros post-GC que sufrieron SHM tras el reconocimiento antigénico.

Sin embargo, la estructura molecular del BCR en la LLC tiene importancia más allá de su estado mutacional. A pesar del fundamento biológico que refuerza la hipervariabilidad de BCR, su repertorio en LLC está sesgado. Hay reordenamientos IGVH constituidos por segmentos génicos más representados, como es el caso de la familia de genes VH1, VH3 y VH4, y en concreto los subtipos IGVH1-69, IGVH4-34, y IGVH3-21; mientras que otros, rara vez representan el clon patológico (IGVH7) (Fais et al., 1998; Johnson et al., 1997).

A día de hoy, la evidencia molecular más sólida que respalda el impulso de determinados antígenos en la selección y activación de clones patológicos en la LLC, surgió del hallazgo de que subgrupos de pacientes no emparentados, portan IG BCR idénticos o casi idénticos, un fenómeno que no puede atribuirse únicamente al azar y que se denomina "estereotipia" (Agathangelidis et al., 2012). Aproximadamente el 30% de los pacientes con LLC, presentan BCRs estereotipados distribuidos en subconjuntos (o subsets), con presentación, curso y evolución clínica similares, incluida la respuesta al tratamiento, y con un *background* biológico común de la enfermedad (Tabla 1.3) (Agathangelidis et al., 2021; Jaramillo et al., 2020).

Subset (frecuencia)	Estado mutacional	Genes IG	Mutaciones driver	Evolución Clínica
Subset #2 (~2,5-3%)	U-LLC y M-LLC	IGVH3-21/(DH)/IGJH6 IGVL3-21	<i>SF3B1</i> y <i>ATM</i>	Muy agresiva (1,9 años)
Subset #1 (~2,2%)	U-LLC	IGVH1-5-7/IGDH6-19/IGJH4 IGVK1-39	<i>NOTCH1</i> , <i>TP53</i> y <i>NFKBIE</i>	Muy agresiva (1,6 años)
Subset #4 (~1%)	M-LLC	IGVH4-34/IGDH5-18/IGJH6 IGKV2-30	ND	Indolente (11,0 años)
Subset #8 (~0,5%)	U-LLC	IGVH4-39/IGDH6-13/IGJH5 IGKV1-39	<i>NOTCH1</i> y trisomía 12	Muy agresiva (1,5 años). Riesgo SR

Tabla 1.3 Características clínicas y biológicas de los subsets mayoritarios en LLC. ND: no determinado. SR: Síndrome de Richter.

En concreto, el subset #2, es el subconjunto estereotipado más representado en LLC, constituye ~2,5–3% de todos los pacientes y ~5,5% de los pacientes que requieren tratamiento. Está compuesto de cadenas pesadas y ligeras codificadas por los genes IGVH3-21 e IGVL3-21, respectivamente, y en su mayoría, presenta estado mutacional M-LLC (~60-65%), aunque independientemente del estado mutacional, tiene pronóstico desfavorable (Gerousi et al., 2021). Recientemente, Stamatopoulos B. y colaboradores, en paralelo con los nuevos hallazgos del grupo alemán, Maity P. et al, han demostrado que la presencia de una mutación adquirida (denominada R110) en IGVL3-21, estimula la señalización autónoma de BCR, y definen un nuevo subgrupo de pronóstico desfavorable, independientemente de que pertenezca o no al subset #2 (Maity et al., 2020; Stamatopoulos et al., 2018).

El subset #8, representa el 0,5% de los casos, y está caracterizado por el reordenamiento no mutado de IGH, IGVH4-39/IGDH6-13/IGJH5, y el reordenamiento IGL, IGKV1(D)-39/IGKJ2. Los pacientes pertenecientes al subset #8, presentan un curso clínico muy agresivo, y tienen mayor riesgo de desarrollar síndrome de Richter (Jaramillo et al., 2020).

1.2.2.3.2 [Otros factores de riesgo relacionados con la activación de BCR.](#)

La molécula CD38, es una glicoproteína transmembrana, implicada en la regulación del crecimiento celular y la diferenciación de los estadios del desarrollo de los linfocitos B. Se encuentra altamente expresada en los linfocitos B maduros activados por el Ag, e inicialmente sus niveles se correlacionan con U-LLC. Esta correlación ha sido objeto de controversia, dada la variación en los niveles de expresión de CD38 a lo largo de la evolución de la enfermedad (Damle et al., 1999).

La proteína ZAP-70 es una tirosina quinasa de la familia SYK/ZAP-70, expresada preferentemente en los linfocitos de linaje T/NK. Aun así, ZAP-70 se expresa aproximadamente en la mitad de los casos de LLC, en particular aquellos U-LLC que tienen una enfermedad clínica relativamente agresiva. Ello, podría deberse a que la expresión de ZAP-70 es capaz de mejorar la señalización de BCR al facilitar el reclutamiento de otras quinasas, como SYK (Wiestner et al., 2003; Zhang & Kipps, 2014).

Si bien se definen como factores de riesgo, su impacto pronóstico no ha podido demostrarse en estudios prospectivos.

1.2.2.4 [Alteraciones citogenéticas en LLC: FISH \(fluorescence in situ hybridization\) y cariotipo.](#)

El cariotipo complejo, definido por la presencia de ≥ 3 alteraciones en el mismo clon, es un indicador de inestabilidad genómica, presente en 15% de los pacientes al diagnóstico alcanzando el 30% con el tratamiento, y descrito como potencial marcador pronóstico de refractariedad (Puiggros et al., 2017; Rigolin et al., 2012).

En los años 2000, Döhner H. y colaboradores, reportaron que casi el 80% de los casos de LLC al diagnóstico presentaban cuatro aberraciones recurrentes detectadas por FISH, con potencial pronóstico y que permitían agrupar a los pacientes en diferentes grupos de riesgo: la pérdida parcial de los cromosomas 13q, 11q y 17p [del(13q14), del(11q22), del(17p13), respectivamente], y la ganancia de cromosomas completos, como la trisomía 12 (+12). En concreto, 80% de los casos presentan entre 0 y 2 alteraciones del número de copias y el 20% restante alberga ≥ 3 (Döhner et al., 2000; Ljungström & Baliakas, 2021).

Al diagnóstico, las más comunes son las del(13q14), seguidas de la trisomía 12 y las deleciones de del(11q22) y del(17p13). La presencia de del(13q14) se asocia con pronóstico favorable similar al de los pacientes con un cariotipo normal. Cuando la trisomía 12 está presente como anomalía única o en

presencia de deleciones de 13q14, se asocia con un riesgo de enfermedad intermedio. En cambio, las del(11q22) y del(17p13) están asociadas con un riesgo de enfermedad desfavorable (González-Gascón Y Marín et al., 2018).

Las del(11q22) comúnmente abarcan el gen *ATM*, que juega un papel crucial en el mantenimiento de la estabilidad genómica y la coordinación de la respuesta al daño del ADN. La incidencia es alrededor del 5-20% en LLC al diagnóstico o al inicio de tratamiento y es significativamente más común en pacientes con enfermedad recidivante o refractaria. La del(17p13) se encuentra en aproximadamente el 3-8% de los casos, aunque puede aumentar hasta el 30% en pacientes tratados con quimioterapia y con LLC refractaria. Los pacientes con del(17p13) se incluyen en la categoría de peor pronóstico, mostrando una SG y una supervivencia libre de progresión (SLP), más cortas (Hallek et al., 2010; Rossi et al., 2013).

Sin embargo, las aberraciones cromosómicas no son responsables de toda la heterogeneidad clínica de la LLC. Entonces se asumía que las mutaciones en ciertos genes, como *TP53*, incluido en la región del(17p13), no ocurrían en ausencia de deleción. Fue en la década de 2010, cuando se agregó a los estudios citogenéticos, información molecular a nivel mutacional (Puiggros et al., 2014; Zenz, Vollmer, et al., 2010c).

1.2.2.5 Relevancia pronóstica del gen *TP53*: guardián del genoma.

El gen *TP53*, también conocido como el "guardián del genoma", es un gen supresor de tumores, ubicado en el brazo corto (p) del cromosoma 17 (17p13.1). Codifica un factor de transcripción, la proteína p53, que participa en el control de la proliferación celular y en la inducción de la respuesta celular al daño en el ADN.

A diferencia de otros genes supresor de tumores, las mutaciones más comunes y mejor caracterizadas en el gen *TP53*, son de tipo missense (70-80%), un tipo de mutación puntual no sinónima que provoca un cambio en el aminoácido codificado. Estas mutaciones missense se encuentran con mayor frecuencia en el dominio de unión al ADN (80-90%), codificado por los exones 4-8, especialmente en 6 hotspots (codones R175, G245, R248, R249, R273 y R282). Se han detectado otras mutaciones de diversa naturaleza: nonsense, mutación sin sentido que provoca la aparición de un codón de terminación prematuro (5-7%); frameshift, inserciones o deleciones que provocan un cambio en la pauta de lectura de la proteína (5-7%); in-frame, inserciones o deleciones que conservan la pauta de lectura de la proteína (<5%); splite site, mutación que altera la región de splicing de la proteína (<5%), sinónimas donde el aminoácido codificante no se ve afectado (<5%). Este tipo de mutaciones pueden comprometer la funcionalidad de la proteína p53, bien impidiendo su actividad transcripcional por verse

afectado el dominio de unión al ADN; o directamente alterando la estructura tridimensional de la proteína (Duffy et al., 2022).

La del(17p13) y/o mutaciones en el gen *TP53*, puede provocar la inactivación completa del locus de TP53. La causa más común, es el resultado de la combinación de mutación de *TP53* y del(17p13), que representa hasta dos tercios de todas las aberraciones de *TP53*. Sin embargo, las mutaciones de *TP53* también ocurren en ausencia de del(17p13) en aproximadamente el 5% de los pacientes no tratados y se asocian con un pronóstico desfavorable, similar al curso de la enfermedad observado en pacientes con del(17p13). Más específicamente, aproximadamente el 90% de los pacientes con del(17p13) portan una mutación *TP53*; por el contrario, solo el 60-70% de los pacientes con mutación *TP53* también albergan del(17p13) (Malcikova et al., 2018). El impacto pronóstico adverso de del(17p13) en la SG en pacientes con LLC, se conoce desde hace ya más de 20 años (Döhner et al., 2000), mientras que el impacto de las mutaciones puntuales del gen apareció más recientemente, y está también asociada a una SG similar (Zenz, Eichhorst, et al., 2010a).

En base a las evidencias, el análisis de las aberraciones de *TP53* por NGS se ha incorporado en la práctica diagnóstica rutinaria para mejorar la estratificación de los pacientes y optimizar las decisiones terapéuticas. De manera similar que para la determinación del estado mutacional de IGVH, el consorcio ERIC, proporciona recomendaciones para garantizar que el análisis se realice de manera oportuna para todos los pacientes que requieren tratamiento y que los datos se interpreten y notifiquen de manera consistente, estandarizada y precisa (Malcikova et al., 2018).

1.2.3 Modelos pronósticos integrados: estratificación del riesgo.

Además, de los sistemas de Rai y Binet (Binet et al., 1981; Rai et al., 1975) se han incorporado con mayor o menos éxito, otros sistemas de estadificación pronóstica que combinan características biológicas, como el nomograma MDACC (Wierda et al., 2007), el modelo GCLLSG (Pflug et al., 2014) y LLC-IPI (Índice pronóstico internacional LLC) (Tabla 1.4) (International LLC-IPI working group, 2016).

1975	1981	2007	2014	2016
Estadio Rai	Estadio Binet	Nomograma MDACC	GCLLSG	LLC-IPI
-	-	Edad	Edad	Edad
-	-	Sexo	Sexo	-
-	-	β2M	β2M	β2M
-	-	Estadio clínico	-	Estadio clínico
Linfocitosis	-	Linfocitos abs	Del17p y del11q	Del17p/mut <i>TP53</i>
Linfoadenopatías y organomegalias	Número de áreas afectadas	Número de áreas afectadas	Estado mutacional IGVH	Estado mutacional IGVH
Anemia	Anemia	-	TK	-
Trombocitopenia	Trombocitopenia	-	ECOG	-

Tabla 1.4 Factores de riesgo de los modelos pronóstico clásicos o sistemas de estadificación. TK: timidina quinasa; ECOG: Escala de evaluación de la calidad de vida del paciente (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG); Abs: absolutos.

Factores pronóstico	Puntuación
Edad >65 años	1 punto
Estadio clínico >0	1 punto
Beta 2 microglobulina >3,5 mg/d	2 puntos
Estado mutacional IGVH no mutado	2 puntos
del17p y/o mut <i>TP53</i>	4 puntos
Grupos de riesgo	Puntuación
Bajo	0-1
Intermedio	2-3
Alto	4-6
Muy alto	7-10

Tabla 1.5 Índice pronóstico LLC-IPI.

Actualmente, el mejor y más validado modelo pronóstico, es el Índice Pronóstico Internacional LLC (LLC-IPI). El LLC-IPI se desarrolló al identificar cinco marcadores pronóstico independientes que predijeron la SG y TPT: la edad, el estadio clínico, la β 2M, aberraciones en el gen TP53 (del(17p13) y/o mutaciones) y el estado mutacional de IGVH (Tabla 1.5) (Yun et al., 2020). A cada biomarcador, se le asignó una puntuación: edad >65 (puntuación de 1), estadio Rai ≥ 1 (puntuación de 1), β 2M $\geq 3,5$ mg/dl (puntuación de 2), IGVH no mutado (puntuación de 2) y presencia de del17p13 por mutación FISH o *TP53* (puntuación de 4). En base a la puntuación, se pudieron identificar cuatro grupos de riesgo, desde pacientes que no deben ser tratados al mostrar muy buen pronóstico sin terapia (bajo riesgo); hasta pacientes de muy alto riesgo (Figura 1.7) (Eichhorst et al., 2021; Hallek et al., 2018).

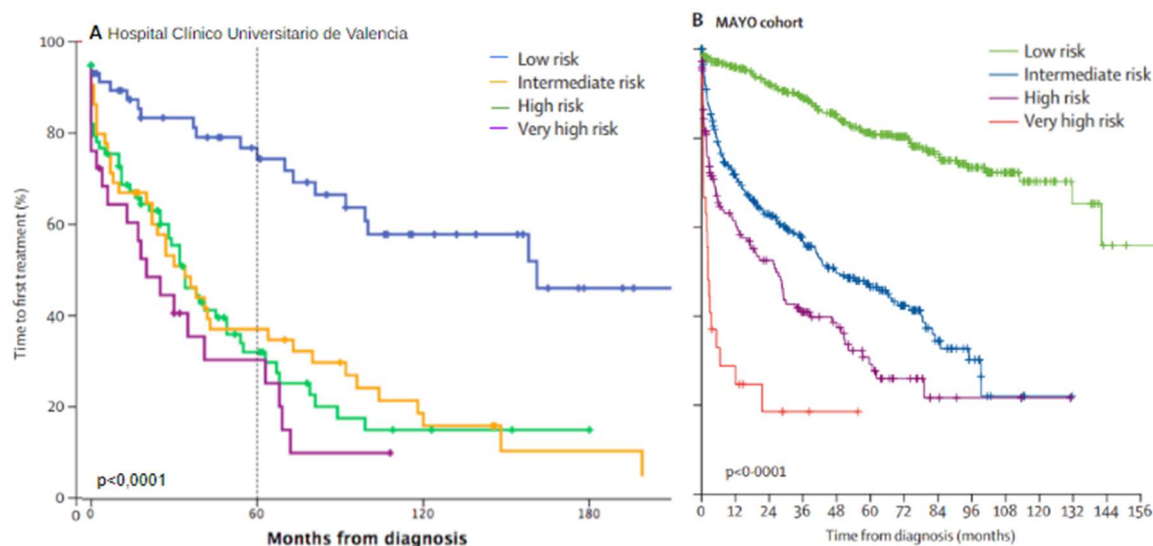


Figura 1.7 Curvas Kaplan-Meier de tiempo hasta el primer tratamiento TPT. A) 205 pacientes con LLC diagnosticados en el Hospital Clínico Universitario de Valencia entre 1986 y 2016. B) Clínica Mayo en los últimos 15 años (adaptación de (International LLC-IPI working group, 2016).

1.2.4 Predicción en LLC: lo que se espera que puede suceder.

Un factor predictivo es una condición o hallazgo que anticipa la eficacia diferencial de una terapia en particular, según el estado de un marcador, es decir, los pacientes con presencia o ausencia de un marcador concreto, responderán de manera diferente a un tratamiento específico.

1.2.4.1 Estrategia terapéutica en la LLC.

Durante décadas, el armamento de tratamiento en la LLC se limitaba a quimioterapia citotóxica con agentes alquilantes y análogos de purina. La incorporación de la inmunoterapia (IQT) basada en el anticuerpo monoclonal anti-CD20, con Rituximab fue un paso decisivo (Hallek et al., 2010). El estudio CLL8 estableció la IQT con Fludarabina, Ciclofosfamida y Rituximab (FCR), como la terapia de primera línea estándar para pacientes con LLC jóvenes sin comorbilidades (Fischer et al., 2016). El ensayo CLL10 demostró que el régimen de Bendamustina y Rituximab (BR) es menos activo que el FCR, pero con mejor tolerancia y ofrecía una supervivencia similar, siendo una alternativa aceptada para pacientes mayores y/o con comorbilidad (Eichhorst et al., 2016). Posteriormente, se incorporaron nuevos anticuerpos anti-CD20, Ofatumumab y Obinutuzumab (Goede et al., 2014; Wierda et al., 2010). Sin embargo, los resultados en pacientes con defectos en la vía p53, por del(17p13) y/o mutación *TP53* continuaban siendo desalentadores (Fischer et al., 2011; Thompson, Tam, et al., 2016b).

Afortunadamente, los resultados son más favorables con las nuevas terapias dirigidas (TD): Ibrutinib, inhibidor de BTK (iBTK); Idelalisib, un inhibidor de la PI3K (iPI3K); y un antagonista de la proteína Bcl-2, Venetoclax (Figura 1.8) (Byrd et al., 2014; Furman et al., 2014; Roberts et al., 2016).

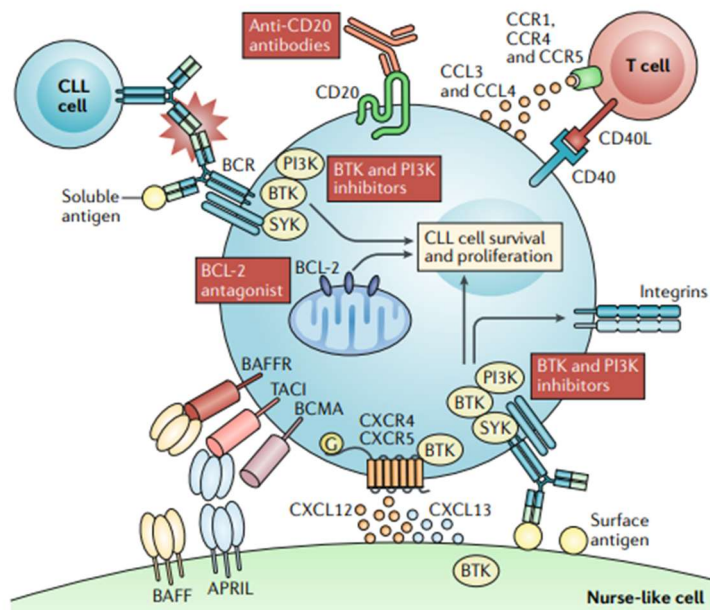


Figura 1.8 Dianas terapéuticas en la LLC. Receptores y vías de señalización sobre los que actúan los agentes terapéuticos tradicionales (anticuerpos anti-CD20) y los nuevos agentes (Ibrutinib, Idelalisib, Venetoclax) (Adaptación de Burger & O'Brien, 2018b).

1.2.4.2 Biomarcadores pronóstico con valor predictivo: los más prometedores.

Si el papel pronóstico del estado mutacional de IGVH está bien consolidado, su importancia como marcador predictivo, en términos de respuesta al tratamiento, es un logro más reciente, tal y como se refleja en las guías International Workshop on CLL (iwCLL) de 2018 (Hallek et al., 2018), y las de ESMO CLL 2021 (Eichhorst et al., 2021), en las que se recomienda estudiar el estado mutacional IGVH

antes del inicio de tratamiento. Esta indicación se originó, al menos en parte, a partir de los resultados del ensayo CLL8 (Fischer et al., 2016), en el que se demostró que pacientes con M-LLC tratados con esquema FCR, mantienen una remisión de la enfermedad a largo plazo, lo que se traduce en una meseta en la curva de SLP, sin recaídas más allá de los 10 años y con una SG similar a la esperada en sujetos sanos. A diferencia de lo que se ha observado con IQT, los estudios con agentes dirigidos no identifican diferencias relevantes en términos de profundidad y duración de la respuesta entre M-LLC y U-LLC, lo que beneficia el rescate del subgrupo más agresivo, U-LLC. El mismo beneficio se documentó en el subgrupo de pacientes U-LLC con el inhibidor de BCL-2 (Al-Sawaf et al., 2020; Munir et al., 2019).

De la misma manera, las aberraciones de *TP53* pertenecen a los marcadores pronósticos y predictivos más potentes que guían las decisiones de tratamiento en la LLC. En concreto, representa el biomarcador predictivo más eficaz en la respuesta al tratamiento con IQT, y mantiene su poder predictivo en la era de los tratamientos dirigidos, concretamente en pacientes en recaída/refractoriedad previamente expuestos a IQT (Malcikova et al., 2018).

Con todo ello, resulta incuestionable el valor pronóstico y predictivo de IGVH y *TP53*, aunque en la era de las nuevas terapias dirigidas, existen biomarcadores potencialmente candidatos que pueden revolucionar el campo pronóstico. Indiscutiblemente, la LLC es una condición paradigmática que requiere un enfoque personalizado y un conocimiento preciso de la biología que subyace a cada paciente individual.

1.2.4.2.1 [Secuenciación de nueva generación: perfil genético mutacional.](#)

La aplicación de las técnicas NGS ha demostrado la alta heterogeneidad genética y epigenética en la LLC, en consonancia con el alto grado de heterogeneidad clínica (Brieghel et al., 2019). Se han identificado mutaciones en más de 2500 genes que afectan a la respuesta al daño en el ADN (p. ej., *ATM*, *TP53*, *POT1*), vías de señalización [p. ej., el receptor tipo Toll (*MYD88*), NF- κ B (*BIRC3*, *NFKBIE*, *EGR2*) y NOTCH (*NOTCH1*, *FBXW7*)], o procesamiento de ARN (ácido ribonucleico) (p. ej., *XPO1*, *SF3B1*). Las mutaciones en varios de estos genes se han relacionado con un curso clínico agresivo, con TPT significativamente más corto y una menor respuesta a la IQT (p. ej., *ATM*, *BIRC3*, *EGR2*, *NFKBIE*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *XPO1*) (Figura 1.9) (Landau et al., 2015; Mansouri et al., 2015; Puente et al., 2015; Sutton & Rosenquist, 2015; E. Young et al., 2017).

- Vía de señalización de NOTCH:

Entre los genes mutados con mayor frecuencia, las mutaciones en *NOTCH1* ocurren en el ~10% de los casos en el momento del diagnóstico, siendo más frecuentes en estadios avanzados de la enfermedad. En concreto, este gen codifica el receptor NOTCH1, implicado en procesos de proliferación celular. La mutación más frecuente en el gen (c.7541_7542delCT) afecta al dominio PEST de la proteína,

impidiendo su degradación por la vía del proteasoma y resultando en un receptor truncado y permanentemente activo (Rosati et al., 2018). Este dominio es necesario para la degradación de NOTCH1 por la vía del proteasoma mediada por la proteína FBXW7. Las mutaciones que afecten al gen *FBXW7* (~3%), provocan un efecto análogo de señalización activa de NOTCH1 (Pozzo et al., 2022).

Las alteraciones en *NOTCH1* se asocian a U-LLC, trisomía del cromosoma 12, estadio avanzado, peor SG y mayor riesgo de transformación a síndrome de Richter. Sin embargo, su impacto en la SLP no está claro (Lazarian et al., 2017; Puente et al., 2011; Rossi, Rasi, et al., 2012b). Los pacientes con *NOTCH1* mutado expresan niveles más bajos de CD20 y no se benefician de la adición de rituximab pero sí de otros anticuerpos monoclonales anti-CD20 como obinutuzumab en terapias combinadas (Bittolo et al., 2017; Stilgenbauer et al., 2014). Estudios preliminares pendientes de validación prospectiva, sugieren que el análisis de *NOTCH1* ofrece la posibilidad de identificar a los pacientes que experimentarán respuestas deficientes, si las hubiere, al rituximab y una supervivencia reducida después del tratamiento.

- Mutaciones en el gen *SF3B1* y la biología del ARN:

Las mutaciones en el gen que codifica el componente del spliceosoma, *SF3B1* (10%), afectan a una región altamente conservada en el dominio C-terminal, interfiriendo en la interacción entre la proteína y el ARN. De este modo, las mutaciones de *SF3B1* provocan un empalme alternativo en las células de la LLC e inducen cambios en el ARN que afectan múltiples vías, como el mantenimiento de los telómeros y la señalización de NOTCH. Además de *SF3B1*, otros genes como *XPO1*, involucrados en el empalme, el procesamiento y el transporte del ARN, presentan alteraciones en LLC a menores frecuencias, lo que sugiere que el procesamiento desregulado del ARN es una de las principales vías patogénicas en el desarrollo de la LLC (Kikushige, 2020).

Se subraya el impacto pronóstico independiente de las mutaciones en *SF3B1* en TPT, SLP y SG (Cortese et al., 2014; Jeromin et al., 2014; Lazarian et al., 2017; Mansouri et al., 2013; Tausch et al., 2020), y la asociación a menor TPT en una cohorte de pacientes Binet A con U-LLC (Baliakas et al., 2019).

- Lesiones en el ADN:

El gen *ATM* es una región diana de la del(11q22). De hecho, en el 30-40% de los pacientes con LLC la delección va acompañada de mutación. Las mutaciones de *ATM* se han relacionado con menor TPT y peor SG (Austen et al., 2005; Rose-Zerilli et al., 2014). Parece que la inactivación bialélica es la que realmente tiene impacto en SLP y SG (Skowronska et al., 2012), aunque existen trabajos discrepantes (Nadeu et al., 2016).

Las mutaciones *POT1* se encuentran en 3% a 7% de los pacientes y se observan con frecuencia en la U-LLC. La proteína POT1 juega un papel esencial en la protección de los telómeros y es necesaria

para mantener la capacidad de autorrenovación de las HSC en la hematopoyesis normal. Las mutaciones de *POT1* en la LLC alteran el dominio de unión al ADN telomérico, lo que lleva a aberraciones estructurales e inestabilidad cromosómica.

- Implicación del BCR, vía TLR:

Las mutaciones en baja frecuencia asociadas a los genes *MYD88*, *BIRC3*, *EGR2* y *NFKBIE*, contribuyen a la activación constitutiva de la vía NF- κ B.

Las mutaciones recurrentes del gen *MYD88*, un adaptador clave en la señalización intracelular del complejo TLR, se localizan exclusivamente en el exón 5 (p.Leu265Pro) y se identifican principalmente en pacientes con marcadores pronóstico favorables, M-LLC y con del(13q). Se trata de una mutación activadora de, entre otras, la vía de señalización NF- κ B (Martínez-Trillos et al., 2014).

BIRC3 pertenece a la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (c-IAP2). Las mutaciones truncan la proteína impidiendo la degradación de MAP3K14, y con ello, la activación no canónica de la vía de NF- κ B. Las más frecuentes son deleciones o inserciones que oscilaron entre 6 y 78 aminoácidos de longitud. Se relacionan con U-LLC, trisomía del cromosoma 12 y del(11q22), región en la que está ubicado el gen (Chiaretti et al., 2014). Algunos estudios lo han asociado con menor SLP y SG (Rossi, Fangazio, et al., 2012a), aunque existe discordancia al respecto. Además, se han relacionado con quimiorrefractoriedad (Blakemore et al., 2020; Nadeu et al., 2016; Tausch et al., 2020).

El gen *NFKBIE*, codifica un regulador negativo de la vía de señalización de NF- κ B, el cual es determinante para el control de la respuesta de la célula B a un estímulo externo, incluyendo la señalización de BCR y TLR. Se han detectado mutaciones de inactivación (*frameshift*) presentes en estadios avanzados de la enfermedad, y asociadas a un pronóstico adverso.

El agrupamiento genético en las diferentes vías de señalización, sugiere que las mutaciones que pertenecen al mismo proceso celular pueden tener impacto clínico y funcional similar. Aun así, la concurrencia de muchas de estas alteraciones dentro de la misma patología, complica el análisis de su relevancia clínica relativa (Delgado et al., 2020).

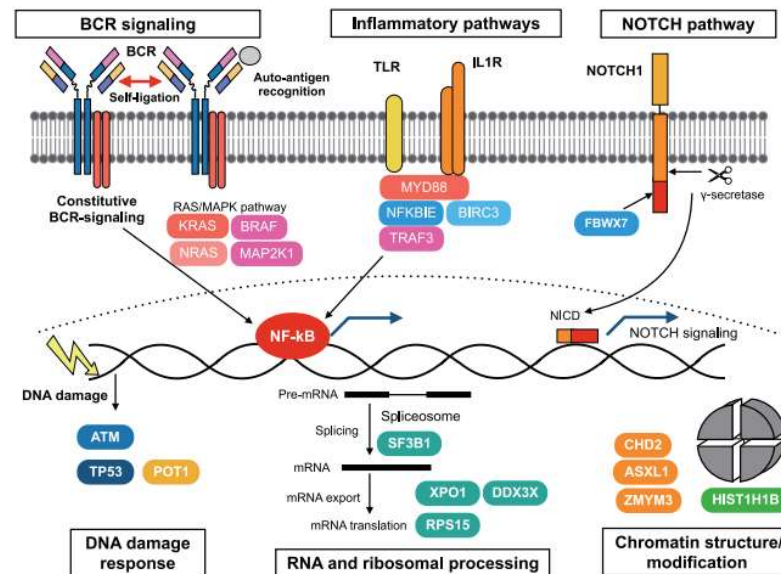


Figura 1.9 Resumen de los genes implicados en las vías de señalización y patogénicas de la LLC. Estas vías biológicas desreguladas se ven afectadas por mecanismos genéticos y no genéticos, y coordinan la leucemogénesis de la LLC. (Adaptación de Kikushige 2020).

1.2.4.2.2 Utilidad clínica de biomarcadores asociados a resistencia.

Con la aparición de los nuevos tratamientos inhibidores de las vías de BTK y BCL2 (Ibrutinib y Venetoclax), se han detectado mutaciones predictivas de resistencia a dichos fármacos, no presentes al inicio de tratamiento (Woyach et al., 2017).

Aproximadamente el 20% de los pacientes desarrollan resistencia a Ibrutinib, con mutaciones en los genes *BTK* y fosfoinosítido fosfolipasa C gamma 2 (*PLCγ2*). La pérdida de función de este inhibidor, en la mayoría de los casos, se debe a la alteración del residuo p.Cys481 de la proteína BTK, aminoácido diana sobre el que se une covalentemente la molécula de Ibrutinib. Además, se han detectado mutaciones menos frecuentes en otras regiones del gen *BTK*: p.Thr316, p.Thr474, y p.Leu528. En cambio, las mutaciones detectadas en el gen *PLCγ2*, son más variadas e involucran los residuos de aminoácidos p.Pro664, p.Arg665, p.Ser707, p.Leu845, p.Asp993, p.Asp1140 y p.Met1141 (Gángó et al., 2020; Lama et al., 2020; St-Pierre & Ma, 2022; Wang et al., 2022).

Los mecanismos subyacentes a la resistencia al Venetoclax están menos definidos. El 50% de los pacientes con LLC que progresan con el fármaco, presentan la mutación en el gen *BCL2* (p.Gly101Val), que reduce notablemente la afinidad de Venetoclax por BCL2 y confiere resistencia adquirida *in vitro* e *in vivo* (Blombery et al., 2019; Tausch et al., 2019).

El hecho de que las mutaciones de resistencia en *BTK*, *PLCγ2* y *BCL2*, se anticipen hasta 15 meses a la recaída clínica, les confiere un papel predictivo (Burger et al., 2016). Sin embargo, estos biomarcadores no se incluyen en los modelos pronósticos vigentes, y su detección no se ha implementado en la práctica habitual, probablemente por limitaciones técnicas, y por la poca certeza

de que la interrupción del tratamiento antes de una progresión clínica tengan beneficios significativos en la supervivencia (Ahn et al., 2021; Albi et al., 2022).

1.2.4.2.3 Enfermedad medible residual: erradicación completa de la LLC.

La respuesta al tratamiento, es uno de los parámetros de mayor valor impacto desde el punto de vista clínico (Tabla 1.6).

Parámetros	RC	RP	PE	EE
Tamaño ganglionar	Ninguno $\geq 1,5$ cm	Disminución $\geq 50\%$	Aumento $\geq 50\%$	Sin cambios objetivos
Tamaño hígado/bazo	Bazo < 13 cm; Hígado normal	Disminución $\geq 50\%$	Aumento $\geq 50\%$	Sin cambios objetivos
Síntomas constitucionales	No	Cualquier	Cualquier	Cualquier
Neutrófilos $\times 10^9/L$	$> 1,5$	$> 1,5$ o elevación $> 50\%$	Cualquier	Cualquier
Linfocitos $\times 10^9/L$	Normal*	Disminución $\geq 50\%$	Aumento $\geq 50\%$	Sin cambios objetivos
Plaquetas $\times 10^9/L$	≥ 100	≥ 100 o elevación 50%	Descenso $> 50\%$ por LLC	Sin cambios objetivos
Hemoglobina (g/dl)	> 11	> 11 o elevación $\geq 50\%$	Descenso ≥ 2 g/dL basal	Sin cambios objetivos
Examen de MO (linfocitosis)	Normocelular, no cél LLC, no nódulos linfoides B	Cél LLC, o nódulos linfoides B o no realizada	Aumento $\geq 50\%$ de cél LLC	Sin cambios objetivos

*La cifra de linfocitos debe ser $< 4 \times 10^9/L$. RC: Respuesta Completa; RP: Respuesta Parcial; PE: Enfermedad progresiva; EE: enfermedad estable.

Tabla 1.6 Recomendaciones para la valoración de respuesta tras tratamiento.

La evaluación de la enfermedad medible residual (enfermedad mínima residual, o EMR) es un indicador muy sensible de la carga de la enfermedad durante y al final del tratamiento, y constituye una herramienta esencial en la valoración de la respuesta (Wierda et al., 2021). En la era de la quimioterapia y IQT, mediante la evaluación de la respuesta convencional al final de un cierto número de ciclos de tratamiento, era posible diferenciar entre pacientes con RC versus RP, donde los pacientes con RC, presentaban una SLP más prolongada que los pacientes con RP. En los análisis combinados de los ensayos de quimioterapia y IQT, se hizo evidente que los pacientes que habían alcanzado niveles indetectables de EMR (iEMR) al final del tratamiento, experimentaron un pronóstico similar, independientemente de si habían alcanzado RC o RP según los criterios convencionales (Kovacs et al., 2016). Estos hallazgos fueron los primeros indicios de que una remisión más profunda se asociaba con un tiempo más prolongado hasta la recurrencia de la enfermedad, por lo que se confirmó que el estado de EMR es un poderoso factor pronóstico independiente (Böttcher et al., 2013).

Con las nuevas terapias dirigidas, raramente se consigue una iEMR. Con Ibrutinib, menos del 10% alcanza iEMR (Burger et al., 2019; Shanafelt et al., 2019). De hecho, estudios de seguimiento a largo plazo, muestran que las tasas de respuesta clínica, en particular las RC, aumentaron con el tiempo; sin embargo, la tasa de iEMR se mantiene baja con sólo un $\sim 6\%$ en SP a los 4 años con Ibrutinib, sin que se haya observado una diferencia significativa en la SLP entre pacientes con y sin iEMR (Ahn et al., 2018). Con Venetoclax, se detectan tasas más elevadas de EMRi, del orden del 26-36% en (Roberts et al., 2019), incluso del 61% si se emplea en combinación (Brander et al., 2018) (Seymour et al., 2017). Los pacientes con iEMR tuvieron la SLP más larga independientemente de RC o RP, lo que sugiere que iEMR es uno de

los marcadores más sensibles para la eficacia del tratamiento también en el contexto de agentes dirigidos.

En la actualidad, el método estandarizado y utilizado con mayor frecuencia para la medición de EMR en LLC se basa en la citometría de flujo (CF) multiparamétrica (Tabla 1.7). En 2018, el grupo ERIC propuso un modelo estandarizado basado en el empleo de paneles de 8 a 10 colores, posibilitando así la estandarización de una metodología con una sensibilidad de hasta 0.0010% (10^{-5}) (Rawstron et al., 2016). Dado que la iwCLL define una EMR indetectable (iEMR) (también expresada como EMR <0,01%; o EMR < 10^{-4} ; o EMR4) (Wierda et al., 2021), como la detección de menos de 1 célula B LLC en 10.000 leucocitos (Hallek et al., 2018; Al-Sawaf et al., 2021).

Otros métodos como la reacción en cadena de la polimerasa aloespecífica (ASO-PCR) del IGVH, pueden incrementar la sensibilidad hasta ($\sim 10^{-6}$). Sin embargo, no permiten cuantificar la EMR, y precisa del diseño de una PCR única y específica para el IGVH de cada paciente, un proceso caro, y laborioso (Tabla 1.7) (Böttcher et al., 2013). La NGS, en cambio, ofrece una alta sensibilidad a un coste aceptable ($\sim 10^{-6}$) (Logan et al., 2013). No requiere cebadores específicos para cada IGVH, y permite identificar, cuantificar y discernir el clon patológico dentro del pool de población policlonal (Tabla 1.7). En este ámbito, la tecnología NGS es capaz de suplir las limitaciones que muestra la secuenciación Sanger, así como de rescatar la mayoría de los casos indeterminados que quedan sin resolver siguiendo las recomendaciones del ERIC para la determinación de IGVH (Agathangelidis et al., 2022).

Método	Características	Ventajas	Desventajas
CF	Detección de marcadores de superficie. Sensibilidad de $\sim 10^{-6}$ con paneles de 8 colores; y de $\sim 10^{-5}$ con paneles de 10 colores	Guías ERIC consensuadas, accesible, asequible, resultados con cuantificación relativamente rápida.	Muestra en fresco de SP o MO (<48 h). Suficiente número de células requeridas para conseguir la sensibilidad. Coste superior.
ASO-PCR	Cuantificación basada en la región hipervariable CDR3 de IGVH alelo y paciente específica. Sensibilidad del $\sim 10^{-5}$	Buena sensibilidad, empleo de ADN (en vez de material en fresco), resultados cuantitativos.	Se requiere una PCR específica para cada paciente, conocer el clonotipo pretratamiento, compleja y laboriosa.
NGS	Medición de las secuencias IGVH específicas de las células LLC basada en una PCR con primers consenso y NGS. Sensibilidad del $\sim 10^{-6}$	Alta sensibilidad, empleo de ADN, seguimiento clonal y resultados cuantitativos.	Experiencia relativa, se necesita conocer el clonotipo pretratamiento, poco utilizado.

CF: Citometría de Flujo; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; ASO-PCR: PCR aloespecífica; NGS: secuenciación de nueva generación; ADN: ácido desoxirribonucleico; SP: sangre periférica; MO: médula ósea.

Tabla 1.7 Metodología aplicable para la evaluación de EMR

Como ejemplo, el kit comercial clonoSEQ ha demostrado una buena concordancia con la CF para la detección de EMR usando como punto de corte 0.010% (10^{-4}) e incluso mayor sensibilidad y buena linealidad con rangos de EMR de 1 en un millón (10^{-6}), siendo la limitación de la sensibilidad, la cantidad de ADN que puede analizarse (Monter & Nomdedéu, 2019; Rawstron et al., 2016). Sin embargo, la variación en la cuantificación entre la CF y la NGS puede ser mayor, siendo necesarios

estudios dirigidos a la estandarización de los análisis cuantitativos con NGS. Además, se presume que el hecho de alcanzar una EMR por debajo de 0.0010% (10^{-5}) se traduce en una mejor evolución clínica, sin embargo esta afirmación precisa ser demostrada en estudios prospectivos.

La evaluación de la EMR es un factor altamente informativo que permite comprender mejor las características de la enfermedad y la cinética de la LLC. Aun así, debido a que el estado de EMR no tiene implicaciones terapéuticas fuera de los estudios clínicos, actualmente no se recomiendan las evaluaciones periódicas de EMR en la práctica habitual.

1.3 Base molecular de la heterogeneidad intratumoral y evolución clonal de la LLC.

En la actual revolución genómica, los datos genéticos y epigenéticos ayudan a construir la historia de las neoplasias hematológicas, y brindan información determinante sobre el papel de la evolución clonal como impulsor neoplásico en la progresión de la enfermedad y en la recaída. Se entiende que la heterogeneidad intratumoral en la LLC proviene de esta variabilidad genética, sin embargo, la posesión de impulsores genéticos no es un requisito imprescindible para la progresión de la LLC, dado que la interacción tanto de factores genéticos, epigenéticos y transcripcionales, así como factores microambientales e inmunológicos, contribuyen a la heterogeneidad intratumoral y la evolución clonal de la LLC (Kwok & Wu, 2021).

La etapa madurativa natural de las células B durante la cual surgen las mutaciones iniciales o “fundadoras” y comienza la diversificación genómica, es ampliamente discutida. Las mutaciones “fundadoras” o clonales, probablemente incluyen impulsores leucemogénicos iniciales que contribuyen a la transformación maligna, mientras que las mutaciones subclonales, o minoritarias, que surgen posteriormente, se expanden hacia la clonalidad concomitantemente con la progresión de la enfermedad, e impulsan la evolución clonal de la LLC (Landau et al., 2013; Schuh et al., 2012).

Una primera teoría apuesta por la leucemogénesis durante los estadios inmaduros de la linfopoyesis. Varios estudios han demostrado que pacientes con LBM que posteriormente progresan a LLC, cuentan con una población clonal y genómica similares, lo que indica que es probable que el proceso de diversificación genómica subclonal que impulsa la progresión leucémica esté establecido durante o antes de la etapa de LBM (Agathangelidis et al., 2018). Esta teoría queda también respaldada por las mutaciones impulsoras detectadas en células madre hematopoyéticas (HSC), así como en células progenitoras linfoides en algunos pacientes con LLC, aunque en frecuencias alélicas bajas (Marsilio et al., 2018). A nivel inmunofenotípico, la aparición de reordenamientos de IGHV estereotipados, en pacientes filogenéticamente no emparentados, refuerza la propuesta de que los eventos que inician la

LLC podrían anteceder a la recombinación somática V(D)J durante la ontogenia del linfocito B (Stamatopoulos et al., 2017).

Por otro lado, los reordenamientos IGVH clonalmente relacionados, reflejarían los eventos de diversificación subclonal que ocurren a partir del clon fundador de la LLC, reforzando así la importancia de la secuenciación de IGHV-D-J para rastrear la evolución clonal en esta enfermedad. Si la alteración genómica inicial en algunos pacientes ocurre a nivel de HSC o células progenitoras, es asumible que ocurran más eventos genómicos después de esto, posiblemente después del compromiso con el linaje de células B y antes del establecimiento del clon de LLC (Bagnara et al., 2021).

Con el inicio del tratamiento se produce un punto de inflexión en la historia natural de la enfermedad. La quimioterapia citotóxica y los tratamientos dirigidos imponen una gran presión selectiva a los clones leucémicos, anulan la mayoría de los demás factores de selección evolutiva y se convierten en un determinante importante de la evolución clonal.

1.3.1 **Evolución clonal: Darwin y más allá.**

La evolución clonal es el proceso natural a través del cual las células buscan continuamente ventajas fenotípicas que les permitan expandirse dentro de las limitaciones del microambiente. En la LLC, la evolución clonal sustenta la progresión leucémica y la resistencia terapéutica, y las diferencias en la dinámica evolutiva clonal explican su curso clínico característicamente diverso. La LLC fue una de las primeras patologías hematológicas caracterizadas por métodos modernos de secuenciación con las que se ha delineado la evolución clonal. Esto se debe en gran parte a su relativa indolencia (permitiendo el muestreo longitudinal a lo largo del curso de la enfermedad), el fácil acceso a muestras de alta pureza a través de venopunciones en serie, y un curso clínico altamente variable que permite mapear las características moleculares para el pronóstico y el seguimiento clínico. La concepción de heterogeneidad genética en la LLC, fue facilitada por los primeros estudios citogenéticos, a los que se les sumó los avances de la tecnología de secuenciación de nueva generación, ofreciéndonos conjuntamente una visión integrada del trazado evolutivo de la enfermedad (Kwok & Wu, 2021).

Algunas aberraciones cromosómicas, como la delección 13q14 y la trisomía 12, están representadas de manera similar en todas las fases de la enfermedad y, por lo tanto, se caracterizan como anomalías genéticas de primera etapa en la LLC. Otros eventos genéticos generalmente representan alteraciones de segunda etapa, que se seleccionan o adquieren progresivamente durante la evolución clonal y que ocurren en una fase más avanzada de la enfermedad (Rossi et al., 2009; Schuh et al., 2012). Según el análisis citogenético convencional y FISH, la evolución clonal consiste principalmente en el desarrollo de delecciones 17p13 o 11q22–q23. La aparición de nuevas mutaciones

adquiridas en *TP53* también contribuye, especialmente en pacientes con LLC resistentes a la IQT y aquellos con síndrome de Richter (Chigrinova et al., 2013; Fabbri et al., 2013). Las mutaciones de *SF3B1*, *ATM* y *BIRC3*, que se correlacionan con un fenotipo clínico más agresivo, pueden surgir durante el curso de la LLC, lo que amplía el espectro de eventos genéticos asociados con la evolución clonal. Esta dinámica evolutiva heterogénea justifica el que la LLC tenga un curso clínico tan divergente, de forma que cuanto mayor sea la heterogeneidad clonal intrapaciente, peor será su pronóstico (Condoluci & Rossi, 2020).

1.3.1.1 Patrones de evolución clonal.

Desde un punto de vista teórico, el muestreo secuencial en diferentes estadios de la LLC ha permitido describir los diferentes patrones de evolución clonal, e incluso insinuar cierta relevancia clínica (Figura 1.10) (Herling et al., 2018; Nadeu et al., 2018).

El equilibrio clonal se caracteriza por la coexistencia de una población leucémica mixta y equilibrada a lo largo del tiempo. Generalmente ocurre en ausencia de una fuerte presión selectiva, como es el tratamiento, o durante la fase de progresión de la linfocitosis de células B monoclonales a la LLC manifiesta. En cambio, una competencia clonal se caracteriza por la presencia de más de un clon, propensos a proliferar según sus alteraciones genéticas.

Los pacientes que carecen de evolución clonal, y por tanto con una genética estable, suelen mostrar una enfermedad más indolente. Nadeu F. y colaboradores, describieron que el 90% de los pacientes con LLC no tratados no mostraron evolución clonal, mientras que hasta el 52% de los tratados desarrollaron cambios clonales (Nadeu et al., 2016). Probablemente, el tratamiento facilita la expansión de determinados clones que están destinados a volverse dominantes al eliminar a sus competidores, hecho que respalda el enfoque *watch and wait* (WW) en ausencia de indicaciones claras de tratamiento para evitar acelerar la evolución clonal y la selección de subclones más agresivos (Condoluci & Rossi, 2020; Fabbri et al., 2013).

En la LLC la evolución clonal después del tratamiento o en el momento de la recaída se ha identificado como “la regla, no la excepción” (Landau et al., 2015). Las poblaciones clonales y subclonales se mantienen en una proporción relativamente similar a lo largo del tiempo, pero pueden experimentar dos patrones principales de evolución clonal tras el tratamiento, evolución lineal o evolución ramificada. En el modelo de evolución lineal, las mutaciones se adquieren secuencialmente en un mismo clon, como es el caso de la transformación a síndrome de Richter (90 % de los casos), pero no en la progresión de la LLC después de la IQT (33% de los casos) o durante la terapia con ibrutinib (7%) (Landau et al., 2017; Ojha et al., 2015). En cambio, la evolución paralela de clones competitivos, a causa de la inestabilidad genómica de las células B LLC, se define como evolución ramificada. Las

mutaciones de las células hijas se extienden como ramas de la generación anterior y eventualmente se vuelven más y más numerosas (Zhu et al., 2021). La evolución multiramificada con >2 subclones que fluctúan con el tiempo es común durante la terapia con IQT (67% de los pacientes) o con ibrutinib (25% de los pacientes) (Landau et al., 2017; Ojha et al., 2015). Hasta el 26% de los pacientes, pueden presentar mutaciones adquiridas en los genes más comúnmente alterados, los genes *driver* en LLC, de los cuales casi el 70% de ellos se ven afectados. Es por ello, por lo que esta evolución ramificada puede producirse como la adquisición de más de una mutación en el mismo gen, también conocida como evolución convergente, o bien, en distintos genes *driver*, evolución divergente (Cahill et al., 2013).

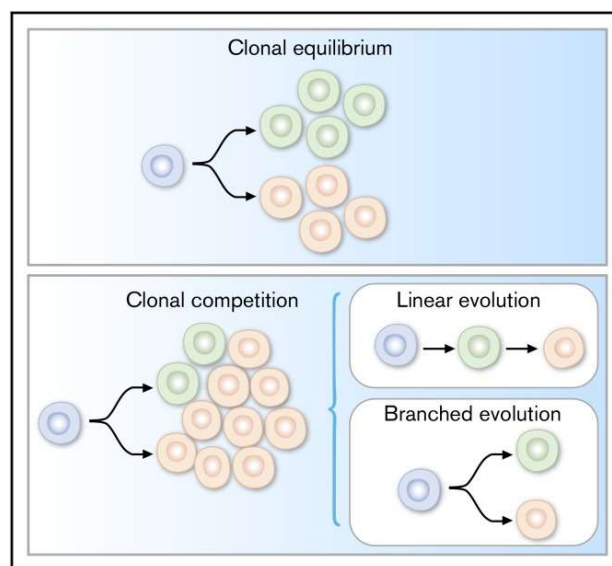


Figura 1.10 Patrones de evolución clonal. La evolución estable mantiene proporciones relativas de los clones, mientras que la evolución ramificada se produce cuando los subclones fuertemente adaptados comienzan a proliferar y se vuelven dominantes después de las resistencias al tratamiento (Ferrando & López-Otín, 2017)).

El patrón evolutivo tras el tratamiento, puede dibujarse como fruto del componente clonal preexistente en el momento previo al tratamiento, y/o según la naturaleza de ese mismo tratamiento. La importancia de lo primero se debe a que es probable que una LLC que alberga un espectro más amplio de alteraciones genéticas, más impulsores subclonales, componentes subclonales más complejos y un crecimiento exponencial desde el diagnóstico hasta el tratamiento, experimente cambios clonales más profundos en la respuesta. Por tanto, la disponibilidad de un grupo más amplio de subclones genéticamente más aptos a partir de los cuales podría desarrollarse resistencia terapéutica, es mayor. De hecho, en muchos casos, el subclon de LLC dominante en el momento de la recaída ya existe como subclon pretratamiento, lo que refleja la selección de subclones resistentes inducida por el tratamiento. En muchos casos, estos subclones con ventaja selectiva son también los que poseen niveles más altos de inestabilidad genómica que los predisponen a alteraciones genómicas adicionales, lo que aumenta la diversificación genética (Kwok & Wu, 2021).

Las distintas modalidades de tratamiento ejercen diferentes presiones selectivas. Es el caso de las mutaciones subclonales en *TP53* y/o del(17p13), que se seleccionan casi invariablemente bajo IQT, mientras que este no suele ser el caso con la TD. Además, la mutagénesis inducida por IQT puede contribuir a la diversificación genética, un proceso que no se observa con la TD. En el caso de las TD, el mecanismo de resistencia implica interferir en la diana molecular del fármaco. Si estas mutaciones de resistencia, surgen *de novo* durante o han existido antes del tratamiento sigue siendo objeto de debate. Los modelos computacionales respaldan la existencia de subclones resistentes antes del inicio del tratamiento, cuestión que también se ha demostrado experimentalmente en muestras de pacientes antes del tratamiento. Aunque en una proporción de pacientes no fue posible detectar mutaciones de resistencia en la fase pretratamiento, sí presentes en muestras posteriores, la detección de mutaciones preexistentes a una fracción de células cancerosas (CCF) baja probablemente se habría visto limitada por la sensibilidad del ensayo.

Se asume que todos los tratamientos de LLC, independientemente de la modalidad, crean algún tipo de cuello de botella evolutivo. Esto altera el panorama subclonal al eliminar los subclones existentes en favor de aquellos con sensibilidad disminuida al tratamiento o mayor ventaja de supervivencia y crecimiento que se "liberan de manera competitiva" en el ecosistema del tumor (Kwok & Wu, 2021).

1.3.1.2 Dinámica de crecimiento en la LLC.

Sigue sin entenderse bien cómo se relacionan las características genómicas con la cinética de la enfermedad individual. La heterogeneidad clínica de la LLC se hace evidente en las trayectorias clínicas tan dispares que se pueden observar entre los pacientes, las cuales reflejan diferentes dinámicas de crecimiento clonal. En base al recuento linfocitario en SP o al tiempo de duplicación linfocitaria, se distinguen distintos patrones de crecimiento (Figura 1.11) (Condoluci & Rossi, 2020).

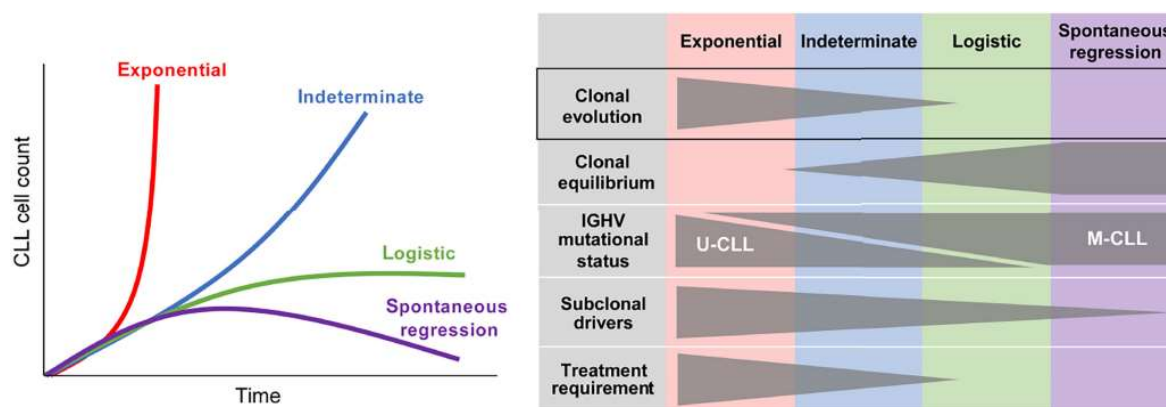


Figura 1.11 Dinámica de crecimiento en la LLC. Patrones que destacan la importancia de la evolución clonal en el crecimiento exponencial y la progresión de la LLC (Kwok & Wu, 2021).

Los pacientes que muestran un crecimiento logístico, tienen una enfermedad que eventualmente requerirá terapia después del diagnóstico, y que alberga características genéticamente favorables como la delección 13q14 y M-LLC. En comparación, los pacientes que muestran un crecimiento exponencial tienen más probabilidades de tener U-LLC, una mayor cantidad de mutaciones *driver* y muestran una evolución clonal más extensa marcada por cambios más profundos en las proporciones subclonales a lo largo del tiempo. Por el contrario, el equilibrio clonal se observa con más frecuencia en pacientes con crecimiento logístico. Además, el equilibrio clonal asociado con una escasa inestabilidad genómica subclonal, parece ser el perfil entre los inusuales casos de M-LLC con regresión espontánea (Gruber et al., 2019; Kwok et al., 2020).

Hipótesis y Objetivos

2 Hipótesis y Objetivos

2.1 *Hipótesis*

Estudios relevantes basados en tecnologías de NGS han permitido identificar e incluso cuantificar alteraciones genéticas recurrentes que probablemente justifiquen la heterogeneidad clínica en la LLC. Las mutaciones somáticas más frecuentes afectan a los genes *SF3B1*, *ATM*, *TP53*, *NOTCH1*, *BIRC3*, *MYD88*, *XPO1*, *EGR2*, *NFKBIE*, *POT1* y *FBXW7*, habiéndose descrito patrones de co-ocurrencia. Se atribuye a la presión ejercida por el tratamiento, un papel relevante en una selección clonal que podría contribuir al desarrollo de síndrome de Richter, y la aparición de mutaciones *de novo* asociadas a la resistencia terapéutica, como las descritas en los genes *BTK* y *PLCγ2*. Sin embargo, quedan cuestiones pendientes de clarificar, como la influencia de variables biológicas y clínicas, así como el impacto de cada tipo de tratamiento en dicha evolución clonal.

Se desconoce en qué medida los parámetros clínicos y las alteraciones clonales impactan sobre la evolución de la enfermedad, y si su estudio puede guiar las decisiones terapéuticas. Por ello se ha diseñado este estudio, a fin de profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la LLC.

2.2 Objetivos

Analizar el impacto en la evolución clonal de variables clínicas, biológicas y moleculares con valor pronóstico y/o predictivo potencial en la LLC. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos secundarios:

- Caracterizar las variables clínicas y biológicas en una serie de pacientes con LLC/LLCP al diagnóstico y antes del inicio de tratamiento.
- Determinar el estado mutacional de *TP53*, *SF3B1*, *BIRC3*, *NOTCH1*, *MYD88*, *XPO1*, *EGR2*, *POT1*, *NFKBIE*, *ATM* y *FBXW7* por secuenciación de nueva generación, y el reordenamiento IGVH, en pacientes diagnosticados con LLC no tratada para valorar la heterogeneidad clonal y su composición subclonal, y correlacionar su potencial impacto clínico.
- Diseñar, optimizar y validar mediante el uso de técnicas de secuenciación masiva, un panel capaz de detectar mutaciones de interés clínico en los genes *BTK* y *PLCγ2*, asociados a resistencias a Ibrutinib.
- Explorar el estudio de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGVH) con técnicas de NGS, para determinar el estado mutacional de IGVH, y seguir el clonotipo en términos de EMR.
- Evaluar la dinámica y la evolución clonal a corto y largo plazo, en muestras secuenciales de pacientes con LLC que han recibido distintas modalidades terapéuticas.

Metodología

3 Metodología

3.1 *Pacientes de la cohorte.*

Se realizó un estudio observacional y retrospectivo en el que se incluyeron un total de 96 pacientes diagnosticados de LLC/LLCP entre 1999 y 2020, según el criterio de clasificación de la National Cancer Institute Working Group guidelines (Hallek et al., 2008), que hubieran requerido una primera línea de tratamiento y existiera disponibilidad de muestras secuenciales obtenidas tanto al inicio de tratamiento como con posterioridad. De los 96 pacientes estudiados, 11 fueron diagnosticados en el Hospital General Universitario Morales Meseguer de Murcia, 9 en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla, 11 en el Hospital Regional Universitario de Málaga, 7 en el Hospital Costa del Sol de Marbella, 4 en el Hospital de Vinaroz de Castellón, 5 en el Hospital General Universitario de Valencia, y 49 en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. De todos ellos, se recogieron las principales características clínicas y biológicas de la enfermedad, así como las fechas de progresión, administración de tratamiento, y respuesta al mismo (Tabla 4.3, Tabla 4.7 y Anexo 2: Tabla 8).

La definición de los criterios de progresión de la enfermedad, así como de la respuesta al tratamiento se realizó en cada centro, de acuerdo con las recomendaciones publicadas en 2008 por IWCLL (Hallek et al., 2008) y su actualización del 2018 (Hallek et al., 2018) referida a los pacientes que reciben tratamiento con inhibidores de la tirosin-quinasa. Se evaluó la respuesta en muestras secuenciales, incluyendo el examen físico, de laboratorio y exploraciones radiológicas si se precisaron. Uno de los criterios limitantes, fue la disponibilidad de muestra antes de la primera y sucesivas líneas de tratamiento, para la evaluación de la respuesta en cada una de las líneas.

El proyecto se desarrolló de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki y los requisitos establecidos por la Legislación Española en los ámbitos de investigación biomédica, protección de datos y bioética. El proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario de Valencia (Nº de orden 2021/080) y todos los pacientes otorgaron el correspondiente consentimiento informado para su inclusión en el proyecto. Además, el CEI del Hospital Clínico Universitario de Valencia autorizó la cesión de muestras para el desarrollo de dicho proyecto en su reunión ordinaria nº 368 de fecha 29 de abril de 2021, y para el almacenamiento de las muestras excedentes de diagnóstico y sucesivas, en el Biobanco del Instituto de Investigación Biomédica INCLIVA, con fines de investigación, de acuerdo con las autoridades reguladoras españolas.

3.2 Recolección y procesamiento de muestras.

Se obtuvo muestra de sangre periférica (SP) al momento de precisar la primera línea de tratamiento, durante el seguimiento y en sucesivas líneas terapéuticas. Para los casos diagnosticados con LLC (n=87), se recogieron 3 tubos de SP de 6mL de K2 EDTA, en cada uno de los tiempos establecidos, y para los pacientes diagnosticados con LLCP (n=9), la muestra de inicio fue, bien adenopatía, aspirado medular o biopsia de médula ósea, mientras que las muestras de seguimiento fueron estudiadas a partir de SP.

Para la extracción de ADN y ARN, se empleó el sistema de extracción automática de ácidos nucleicos Maxwell® 16 o Maxwell® RSC (Promega Corporation, Madison, USA), mediante los kits Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit o Maxwell® RSC Blood DNA Kit (Promega Corporation, Madison, USA), y Maxwell® RSC simplyRNA Blood Kit (Promega Corporation, Madison, USA), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. En los casos con una carga periférica inferior a 5×10^9 /L linfocitos B clonales, fue necesario un enriquecimiento poblacional a partir de la selección positiva de linfocitos CD19+ con bolas magnéticas con el kit EasySep™ Human CD19 Positive Selection (StemCell Technologies).

La cantidad y calidad de los ácidos nucleicos extraídos, se determinó mediante espectrofotometría con Nanodrop-2000 (Thermo Scientific); siendo la absorbancia a una longitud de onda entre 260 nm y 280 nm, la que determina la pureza de la extracción; y entre 260 nm y 230 nm, la que detecta restos de compuestos orgánicos. En base a este criterio, se seleccionaron las muestras de mejor calidad, con concentraciones superiores a 20ng/ μ L, y con valores de ratio de Abs260/280nm de \sim 1.8 en el caso de ADN, y de \sim 2.2 para el ARN.

3.3 Estudio del perfil genético y alteraciones moleculares.

Se estudió el perfil genético de cada paciente sobre 93 muestras iniciales y 302 muestras de seguimiento, a partir de ADN, con la estrategia basada en secuenciación por amplicones (*targeted sequencing*). Se analizó de manera individual con el fin de determinar el potencial patogénico de las variantes detectadas y su importancia en la dinámica de la enfermedad (Figura 3.1).

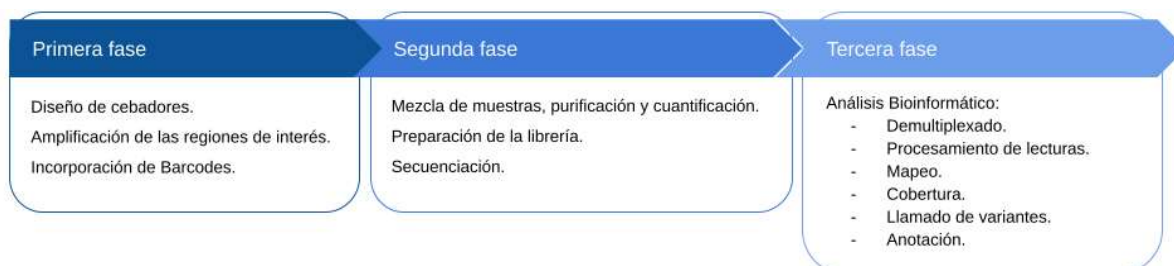


Figura 3.1 Flujo de trabajo seguido para el estudio del perfil genético por NGS.

3.3.1 Primera fase:

3.3.1.1 Caracterización molecular: paneles OG-CLL, OG-CLL2, OG-TP53 y OG-ATM.

Se estudiaron cuatro paneles de secuenciación personalizados siguiendo las recomendaciones específicas de cada kit (OncogenBasic, Seqplexing, Valencia, España). Un total de 227 regiones se incluían en 4 paneles independientes, OG-CLL, OG-CLL2, OG-TP53 y OG-ATM (OncogenBasic, Seqplexing, Valencia, España), con los que se generaron amplicones de una longitud 150-250 pares de bases (pb) (Tabla 3.1).

Panel	Gen	Proceso Biológico	Id. Gen Ensembl	Id. Tránsito	Exones	Amplicones (nº)
OG-TP53	<i>TP53</i>	Daño ADN/control ciclo celular	ENSG00000141510	NM_000546	Todos	19
OG-CLL	<i>BIRC3</i>	Transducción de señales vía NFkB	ENSG0000023445	NM_182962	6-9	9
	<i>NOTCH1</i>	Transducción de señales vía notch	ENSG00000148400	NM_017617	34	15
	<i>MYD88</i>	Señalización receptores Toll-like	ENSG00000172936	NM_002468	5	2
	<i>SF3B1</i>	Procesamiento y splicing del RNA	ENSG00000115524	NM_012433	14-16	7
	<i>NFKBIE</i>	Señalización vía NFkB	ENSG00000146232	NM_004556	1	8
OG-CLL2	<i>XPO1</i>	Procesamiento y splicing del RNA	ENSG00000082898	NM_003400	14-16	5
	<i>EGR2</i>	Señalización vía NFkB	ENSG00000122877	NM_000399	1-2	14
	<i>FBXW7</i>	Transducción de señales vía notch	ENSG00000109670	NM_033632	8-12	12
	<i>POT1</i>	Daño ADN	ENSG00000128513	NM_015450	6-9	10
OG-ATM	<i>ATM</i>	Daño ADN/control ciclo celular	ENSG00000149311	NM_000051	1-41, 43-62	126

Tabla 3.1 Distribución y características de los genes incluidos en cada uno de los paneles a estudio.

3.3.1.2 Resistencia terapéutica: diseño del panel IBR-R.

Se diseñó el panel IBR-R, que incluía las regiones exónicas y las zonas de splicing del gen *BTK* y del gen *PLCγ2* (Tabla 3.2).

Panel	Gen	Proceso Biológico	Id. Gen Ensembl	Id. Tránsito	Exones
IBR-R	<i>BTK</i>	Señalización BCR	ENSG00000010671	NM_000061	Todos
	<i>PLCγ2</i>	Señalización BCR	ENSG00000197943	NM_002661	Todos

Tabla 3.2 Distribución y características de los genes *BTK* y *PLCγ2* incluidos en el panel IBR-R.

Se obtuvieron las secuencias genómicas a partir de las bases de datos COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, v89, mayo 2019) y Ensembl (Ensembl genome browser , v97, julio 2019), utilizando la versión del genoma de referencia GRCh38/hg38 y aplicando el filtro $MAF > 0,01$ (se muestran las variantes con un MAF superior al 1%), siendo para el caso del gen *BTK*, NM_000061.3, (transcript ID ENST00000308731.8) y para el gen *PLCγ2*, NM_002661.5 (transcript ID ENST00000564138.6). Para el diseño *in silico* de los cebadores, se utilizó el programa informático de libre uso jPCR (v0.4.0., <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Las condiciones generales del diseño de cebadores fueron: tamaño del producto de alrededor de 150pb, una longitud de cebadores de 18 a 22pb, una temperatura *melting* de 58-62°C con una diferencia máxima de un grado entre cebadores de cada pareja, y un porcentaje de GC del 20-80%. A todos ellos, se les incorporó la secuencia propia de los adaptadores “Nextera”, complementarias a la plataforma de secuenciación Illumina (Illumina, Inc, San Diego, EE.UU.); para los cebadores en 5' fue la cola_nextera_5':

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3', y para los cebadores en 3', la cola_nextera_3': GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG.

3.3.1.3 Amplificación de las regiones de interés: PCR selectiva.

El enriquecimiento de las regiones incluidas en los paneles OG-CLL, OG-CLL2, OG-TP53 y OG-ATM, se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones específicas de cada kit (OncogenBasic, Seqplexing, Valencia, España). El panel IBR-R, se amplificó en dos PCR multiplex distintas por cada paciente a estudio, una por cada pool de cebadores (Multiplex Pool A y Multiplex Pool B) (Figura 3.2), a partir de 10ng de ADN, en un termociclador Veriti® Thermal Cycler (Tabla 3.3):

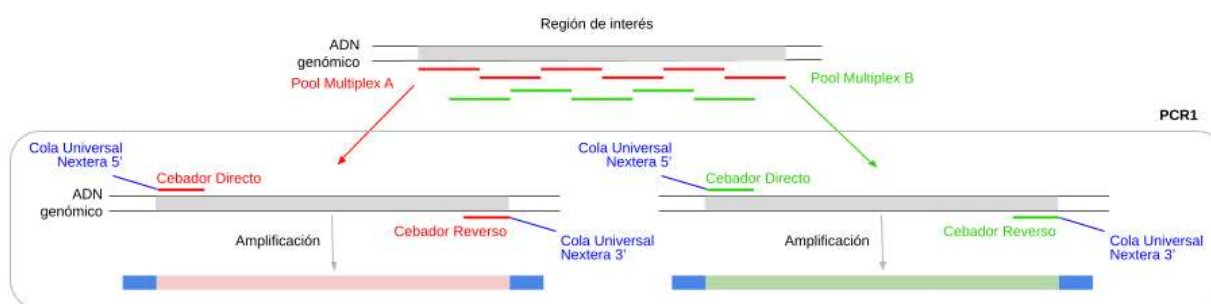


Figura 3.2 Esquema de PCR para la amplificación de las regiones de interés.

A) Reactivos PCR selectiva multiplex		Volumen (µL)		
ADN genómico ~50ng		1.0		
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN; Germany)		7.5		
Pool cebadores (µM)		2.0		
Agua libre de nucleasas		4.5		
Volumen total de reacción		15.0		
B) Condiciones de amplificación		Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación inicial		95 °C	15 min	
Desnaturalización		95 °C	20 sec	
Hibridación		55 °C	30 sec	20x
		60 °C	30 sec	
		72 °C	30 sec	
Extensión final		72 °C	5 min	
Cooling		15 °C	∞	

Tabla 3.3 Reactivos PCR selectiva Multiplex y condiciones de amplificación Panel IBR-R. A) Reactivos y volumen de cada uno de ellos para la amplificación por muestra. B) Condiciones de PCR1.

3.3.1.4 Incorporación de barcodes.

Se identificaron las muestras de forma inequívoca, mediante etiquetas moleculares (*Barcodes*). Se agruparon los dos productos amplificados (Multiplex A + Multiplex B) por muestra, y se incorporaron adaptadores universales para las reacciones de NGS con sistema Illumina, y *barcodes* (Figura 3.3), en un termociclador Veriti® Thermal Cycler con 38 ciclos de amplificación (Tabla 3.4). Se verificó el producto final mediante electroforesis capilar en el sistema automatizado Qiaxcel (Qiagen N.V. Hilden, Alemania).

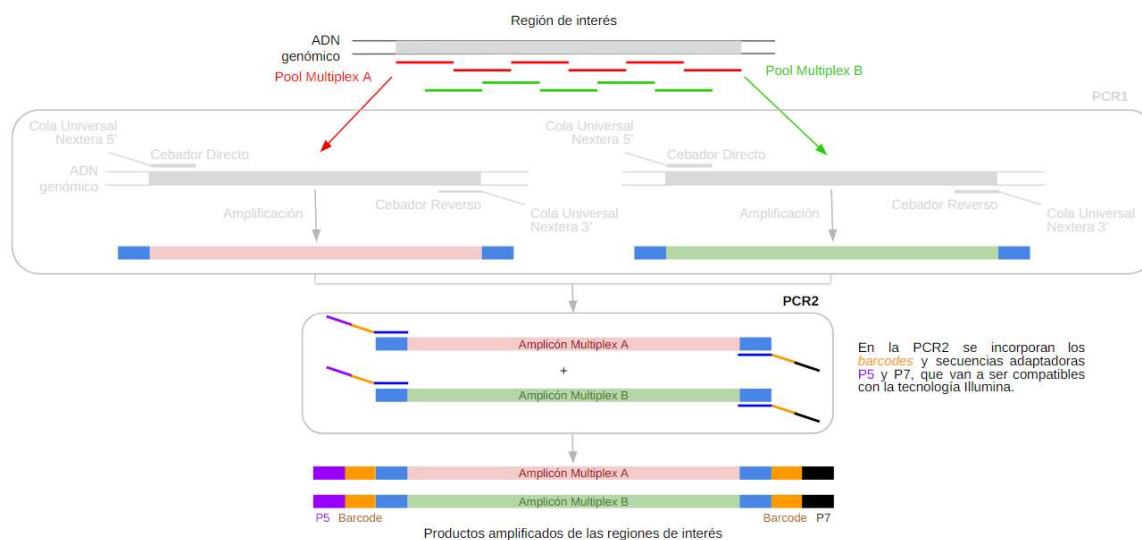


Figura 3.3 Esquema de incorporación de las secuencias identificadoras de los productos de la PCR1.

A) Reactivos PCR2		Volumen (µL)
Amplicón Pool A + Pool B		2.0
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN; Germany)		7.5
Barcodes		1.0
Agua libre de nucleasas		4.5
Volumen total de reacción		15.0
B) Condiciones de amplificación		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	15 min	38 x
98 °C	20 sec	
60 °C	30 sec	
72 °C	60 sec	
72 °C	10 min	
15 °C	∞	

Tabla 3.4 Reactivos PCR2 y condiciones de amplificación. A) Reactivos y volumen de cada uno de ellos para la amplificación por muestra. B) Condiciones de PCR2 para la incorporación de barcodes.

3.3.2 Segunda fase:

3.3.2.1 Mezcla de muestras, purificación y cuantificación.

Se generaron pools añadiendo 2µL de cada muestra amplificada en un tubo común. Estos pool, se purificaron con bolas magnéticas 0.6X Magsi-NGS PREP® (MagnaMedics Diagnostics B.V., Países Bajos), y se cuantificaron con el kit QuantiFluor® dsDNA System (Promega, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante en ambos casos. En base a la cuantificación de cada librería, se diluyeron hasta conseguir una concentración final de 4nM.

3.3.2.2 Preparación de las librerías.

Se desnaturalizaron los pools con NaOH 0.2N (221465, Sigma-Aldrich) y se diluyó con el tampón de hibridación (HT1) hasta conseguir una concentración final de 10pM. Como control del proceso, se utilizó el PhiX Control v3 (Illumina, Inc, San Diego, EE.UU.) diluido a 12.5pM y en una proporción adecuada a la variabilidad de la muestra, 30µL de librería PhiX a 12.5pM y 570µL de librería desnaturalizada a 10pM.

3.3.2.3 Protocolo de secuenciación.

El proceso de secuenciación se realizó empleando el sistema de secuenciación MiSeq® (Illumina®, California) del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, a partir de kits Miseq Reagent v2 (Illumina®, California), para la secuenciación óptima de fragmentos de 150pb en ambos sentidos, *paired-end*, en un tiempo estimado de 48 horas, cuya secuenciación consta de un primera fase de generación de *clusters* mediante amplificación clonal, y una segunda fase de secuenciación por síntesis.

La primera fase del proceso se basa en la formación de grupos o *clusters*. Las librerías hibridaron con las secuencias adaptadoras presentes en la celda de flujo o *flow cell*, complementarias a los adaptadores universales de los amplicones durante la PCR2, junto a los *barcodes*. Tras un primer proceso de desnaturalización (Figura 3.4 a)), las hebras de cadena sencilla hibridan con la *flow cell* por su extremo 5', y comienza la reacción de amplificación clonal. Tras un proceso de amplificación isotérmica, el extremo 3' de cada cadena puede hibridar con adaptadores complementarios cercanos, formando una estructura en puente que permite la amplificación en el sentido inverso. Este paso se repite en varios ciclos llegando a formar hasta 200 *clusters* compuestos de moléculas idénticas (Figura 3.4 b)). Tras la amplificación clonal, comienza la secuenciación por síntesis (SBS) de Illumina (Figura 3.4 c)). Emplea desoxinucleótidos (dNTPs) marcados con un fluoróforo diferente y con una modificación en el grupo -OH de su extremo 3', convirtiéndolos en terminadores reversibles.

La secuenciación se inicia con la adición de un nuevo dNTP sobre la cadena molde, el cual impide la extensión de la cadena por su extremo bloqueante. A continuación, tras la eliminación del exceso de desoxinucleótidos no incorporados, se produce la identificación de dicho dNTP gracias a la excitación del fluoróforo que lleva ligado (Figura 3.4 d)). Finalmente, se añade un agente químico capaz de eliminar el grupo bloqueante, permitiendo la adición de una nueva base y el inicio de un nuevo ciclo de secuenciación. La señal de fluorescencia será posteriormente analizada por el sistema óptico del equipo (Figura 3.4 e)) (Slatko et al., 2018); (Ambardar et al., 2016; Metzker, 2010).

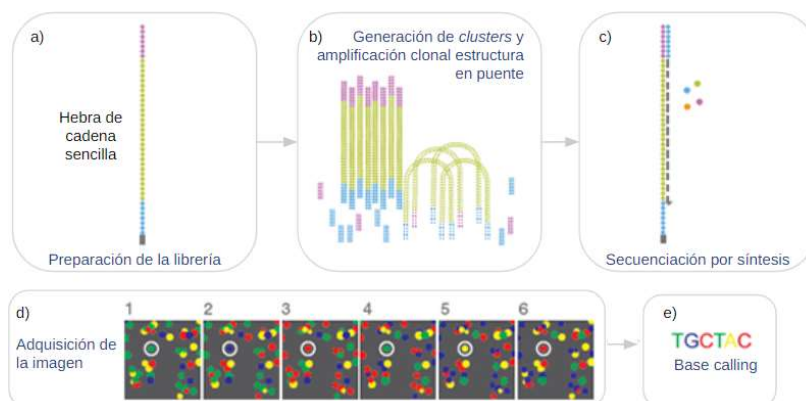


Figura 3.4 Resumen del proceso de secuenciación del sistema MiSeq de Illumina. a) Preparación de la librería, b) Generación de clusters y amplificación clonal, c) Secuenciación por síntesis (SBS), d) Adquisición de la imagen tras la excitación del fluoróforo, e) Traducción de las señales de fluorescencia, en secuencia de nucleótidos.

3.3.3 Tercera fase:

Para el análisis e interpretación de variantes se utilizó la *pipeline* desarrollada por el personal bioinformático de la Unidad de Genómica y Diabetes de la Universidad de Valencia, mientras que la gestión de recursos corrió a cargo de la Unidad de Bioinformática del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA (Figura 3.5).



Figura 3.5 Esquema del flujo de trabajo bioinformático para el procesamiento de los datos obtenidos por NGS Miseq.

3.3.3.1 Demultiplexado y generación de archivos FastQ.

Tras la secuenciación, *Miseq Reporter Software 2.5.1* (MSR), llevó a cabo el análisis inicial de demultiplexado de muestras y la unificación de toda la información en archivos FastQ, donde quedaron almacenados los datos de secuencia y calidad de cada una de las bases incorporadas durante la secuenciación.

3.3.3.2 Control de calidad y trimming

Se evaluaron los diferentes parámetros de calidad con el programa FastQC (v0.11.5, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), y la herramienta setqk trimfq en su versión v1.2.

3.3.3.3 Mapeo y coberturas

Los datos de mapeo o alineamiento con el genoma humano de referencia (GRCh37.p13), se obtuvieron a partir del software BWA (Burrows-Wheeler-Aligner) v0.7.15. (Li & Durbin, 2009) y el software SAMtools v1.7 (Li, 2011), en archivos con formato .BAM (del inglés Binary Aligment Map). Se empleó un código de análisis propio basado en parámetros del programa BEDtools (V2.23.0) para el análisis de coberturas.

3.3.3.4 Llamado y anotación de variantes.

El genotipo de cada muestra quedó recogido en archivos .VCF (del inglés Variant Call Format) a partir del programa Freebayes v1.1.10. Para la anotación de variantes, se construyeron archivos .CSV utilizando la herramienta VEP (McLaren et al., 2016) con la versión Ensembl 97.

3.3.4 Filtrado y análisis de variantes.

Todas las variantes reportadas en el análisis bioinformático, fueron comprobadas visualmente en el software Integrative Genomics Viewer (IGV; Broad Institute) (Thorvaldsdóttir et al., 2013).

La significación clínica de las variantes filtradas, se comprobó en la literatura (PubMed; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y en las bases de datos Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC; <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), Leiden Open Variation Database (LOVD; www.lovd.nl), y Human Gene Mutation Database (HGMD; <http://www.hgmd.cf.ac.uk>). En concreto, para el gen *TP53*, se consultaron las bases de datos específicas de este gen, IARC TP53 Database (<https://p53.iarc.fr/>) y Seshat (<http://vps338341.ovh.net/>). La patogenicidad potencial de las mutaciones *de novo* se evaluó utilizando los algoritmos *in silico* SIFT (<http://provean.jcvi.org>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) y Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>) (Grimm et al., 2015). Para variantes localizadas en sitios de *splicing*, se utilizaron los algoritmos Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3>), NNSplice (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>) y Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>) para predecir su potencial patogenicidad (Jian et al., 2014).

En base a la frecuencia alélica de la variante reportada (VAF%), se clasificaron las variantes en clonales (VAF >10%), subclonales de alta frecuencia (VAF ≥5%) y subclonales de baja frecuencia (VAF <5%). Estos criterios de clasificación, fueron aplicados en base al límite de detección que presenta la técnica de Sseq (VAF >10-12%), y a partir del cual, todas las variantes detectadas por las técnicas de nueva generación que se encuentren en un VAF <10%, se consideran de significado clínico incierto en la práctica clínica habitual.

3.4 Pruebas de validación: panel IBR-R.

Las capacidades del panel IBR-R fueron evaluadas en términos de exactitud, precisión, sensibilidad y especificidad analítica bajo condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad, siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 15189 (Guzel & Guner, 2009, ISO/IEC 15189, 2012). Para ello, se emplearon muestras control cedidas por la Unidad de Biología Molecular del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona, con variantes de diferentes frecuencias mutacionales localizadas en el gen *BTK* y *PLCγ2* (Tabla 3.5).

Muestras	Descripción variante	VAF (%) esperada
Control_BTK_pl1	c.1442A>C_p.Cys481Ser	100
Control_BTK_pl2	c.1441T>A_p.Cys481Ser	100
Control_BTK_pl3	c.1442A>C_p.Cys481Ser	6
	c.1441T>A_p.Cys481Ser	15
Control_BTK_pl4	c.1442A>C_p.Cys481Ser	30
Control_PLCG2_pl1	c.1990C>T_p.Pro664Ser	100
Control_PLCG2_pl2	c.2977G>C_p.Asp993His	100
Control_PLCG2_pl3	c.1990C>T_p.Pro664Ser	30
	c.2977G>C_p.Asp993His	10
Control_PLCG2_pl4	c.1990C>T_p.Pro664Ser	10
	-	-
Control_WT	-	-

Tabla 3.5 Muestras control para la validación del panel IBR-R, con mutaciones de distinta frecuencia alélica tanto en el gen BTK como PLCγ2 (Concentración 200ng/μL) (VAF: frecuencia alélica de la variante).

- Exactitud: expresada como el error relativo del valor obtenido con respecto al valor asignado de muestras controles. Fueron analizadas por cuadruplicado, en cuatro amplificaciones con *barcodes* diferentes, y en cuatro carreras de secuenciación distintas, para obtener el promedio de los porcentajes con sus correspondientes desviaciones estándar y errores relativos.
- Precisión: evaluada en términos de repetibilidad (*intra-run*) y reproductibilidad (*inter-run*), teniendo en cuenta el coeficiente de variación (CV). Fueron analizadas por triplicado, en tres amplificaciones con *barcodes* incorporados diferentes, en una misma carrera para evaluar la repetibilidad; y en tres carreras de secuenciación distintas para determinar la reproducibilidad. No fue posible evaluar la reproducibilidad en diferentes equipos por falta de disponibilidad.
- Sensibilidad y especificidad: a partir de dos muestras control con mismo VAF (%) (Control_BTK_pl4 y Control_PLCG2_pl3) y el control sin alteraciones (Control_WT), se prepararon mezclas en distintas proporciones (IBR-R1, IBR-R2, IBR-R3, IBR-R4, con 10%, 5%, 2% y 1% de carga mutacional) y se procesaron en tres amplificaciones con *barcodes* diferentes, y en cuatro carreras de secuenciación buscando obtener 1000, 500, 250 y 100 lecturas por amplicón, respectivamente (Anexo 1: Tabla 1).

3.5 Estudio de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGVH).

3.5.1 Determinación de IGVH: secuenciación Sanger (Sseq).

Se empleó ADN y ARN como material de partida. Para la retrotranscripción a ADNc (ADN complementario) se empleó el kit comercial Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Fisher, Massachusetts, EEUU). En la amplificación por PCR, se emplearon los cebadores específicos del locus de IGVH (Fais et al., 1998), a partir del subconjunto leader (cebadores directos) y el cebador JH consenso (cebador inverso). Como alternativa excepcional, se emplearon los cebadores FR1 (René et al., 2014; van Dongen et al., 2003) (Figura 3.6; Tabla 3.6;

Anexo 1: Tabla 2).

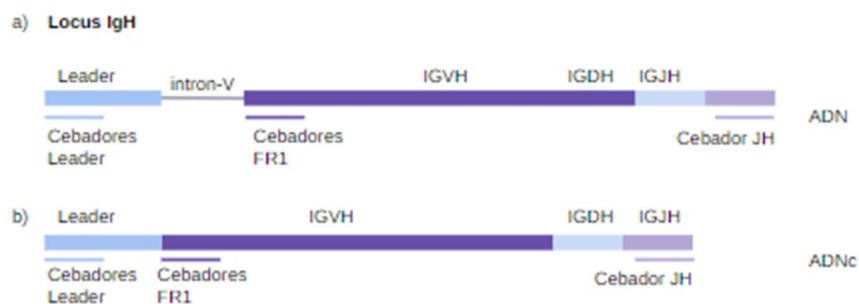


Figura 3.6 Locus IGHV: localización de los cebadores complementarios a las regiones Leader, FR1 y JH. a) Amplificación por PCR a partir de gDNA, con un tamaño medio de fragmento esperado superior por la amplificación de la región intrónica V. b) amplificación por PCR a partir de ADNc.

A) Reactivos PCR uniplex		Volumen (µL)	
ADN ~50ng; ADNc		1.0	
AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (Applied Biosystems™)		12.5	
VH1/VH2/VH3-21*/VH4/VH5/VH6 (5µM)		2.5	
JH (5µM)		2.5	
Agua libre de nucleasas		5.5	
Volumen total de reacción		24.0	
B) Condiciones de amplificación		Temperatura	Tiempo
Activación inicial		95 °C	10 min
Desnaturalización		94 °C	30 sec
Hibridación		63 °C	30 sec
Extensión		72°C	45 sec
Extensión final		72 °C	10 min
Cooling		15 °C	∞

Tabla 3.6 Reactivos y condiciones para la amplificación por PCR de IGVH.

La comprobación de los fragmentos amplificados se realizó con el sistema avanzado Qiaxcel (Qiagen, Alemania), con un tamaño medio esperado de 510-560pb para los productos de PCR que partían de ADN y de 400-450 pb en el caso de ADNc. Se purificó con ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher, Massachusetts, EEUU) y secuenció con BigDye Primer Sequencing Kit (Thermo Fisher, Massachusetts, EEUU) junto con los cebadores VH específicos con los que se obtuvo el primer producto de PCR (Tabla 3.7). La Sseq se realizó con el equipo ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Estados Unidos).

A) Reactivos PCR purificación	Volumen (µL)	B) Reactivos PCR Secuenciación	Volumen (µL)
Producto primera PCR uniplex	8.0	Producto PCR purificación	5.0
ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent	3.0	BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	1.0
Volumen total de reacción	11.0	BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer	4.0
		VH1/VH2/VH3-21*/VH4/VH5/VH6/ JH (2.5µM)	1.0
		Volumen total de reacción	10.0
		Producto PCR purificación	5.0

Tabla 3.7 Reactivos para la purificación (a) y secuenciación (b) del reordenamiento IGVH.

Como método estándar de análisis, tal y como recomiendan las guías (Rosenquist et al., 2017), se visualizó el cromatograma en crudo con la herramienta Chromas software (Technelysium Pty Ltd, Australia), y el análisis del estado mutacional del reordenamiento, mediante la herramienta IMGT/VQUEST. Esta, proporciona el cálculo automático del porcentaje de identidad de IgHV con respecto a la línea germinal, el número y descripción de las mutaciones por FR-IMGT y CDR-IMGT, y la identificación y localización de dichas mutaciones con respecto a la línea germinal (Alamyar et al., 2012).

La herramienta bioinformática ARResT/AssignSubsets (Bystry et al., 2015) se reservó para la estereotipia IGVH de BCR (Agathangelidis et al., 2019; Rossi & Gaidano, 2010)

3.5.2 Determinación de IGVH y seguimiento: método NGS.

La optimización del protocolo que se expone a continuación se realizó en colaboración con la Unidad de Genómica y Diabetes de la Universidad de Valencia (Figura 3.7 a)). Se llevó a cabo una primera PCR anidada multiplex a partir de 200ng ADN, con los subconjuntos de cebadores descritos anteriormente (Langerak et al., 2007, 2012; van Dongen et al., 2003) de las regiones estructurales FR1, FR2 y FR3 con extremos complementarios a los adaptadores Nextera (Illumina, California, EE. UU.) y la enzima QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Alemania) (Anexo 1: Tabla 3). La secuenciación se realizó siguiendo el proceso antes detallado (3.3.1.4), y el protocolo de secuenciación Illumina MiSeq V2 150x2 (17 pM. con Phix al 5 %) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Figura 3.7 b)).

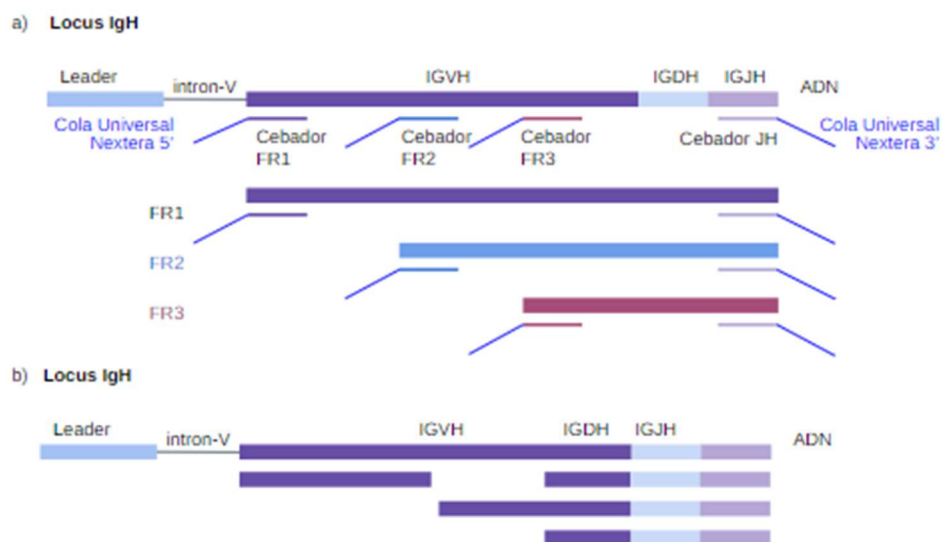


Figura 3.7 Esquema de PCR para la amplificación de IGVH por NGS. a) PCR anidada multiplex compuesta por la combinación del pool de cebadores que acotan las 3 regiones FR (framework) del locus IGH. b) Distribución de las lecturas obtenidas con cada set de cebadores tras la secuenciación 2x150 Illumina.

Para la determinación de IGVH por NGS se recurrió a la *pipeline* específica B-MyRepCLL, producto de la tesis doctoral de Azahara Fuentes (para más información <https://github.com/afuentri/B-MyRepCLL>).

3.6 Citometría de Flujo y enfermedad medible residual.

Los estudios de citometría se realizaron en muestras de SP, tras la lisis de los eritrocitos tal y como recomienda Euroflow (Kalina et al., 2012). Se utilizó la combinación de 8 colores propuesta por ERIC (Rawstron et al., 2016) para el estudio de EMR que incluye los marcadores celulares CD19, CD20, CD5, CD43, CD79b, CD81 y CD3. La adquisición se realizó en un FACSCanto II Becton-Dickinson

Biociencias con el software FACSDiva (V8.0; BD). El software de análisis fue el Infinicyt softwareTM (Cytognos SL, Salamanca, Spain). El valor de EMR se informó como la fracción de células de LLC respecto al total de células nucleadas, siendo la EMR negativa como una fracción $<1 \times 10^{-4}$.

3.7 Análisis estadístico.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el paquete informático SPSS 22.0 (SPSS, Chicago, IL). Los test utilizados fueron el test de Wilcoxon para datos pareados, y para las variables cualitativas el test de McNeman para variables en dos grupos y el test Q de Cochran para más de dos grupos. Para el análisis univariante de factores asociados a riesgo de recaída se utilizó la prueba de prueba χ^2 para variables categóricas, las pruebas paramétricas t de Student y ANOVA, además de las no paramétricas (U de MannWhitney), para variables continuas. El análisis multivariante se realizó mediante el modelo de regresión múltiple de Cox (paso a paso), donde se incluyeron las variables que en el análisis univariante mostraban relación con la supervivencia con un grado de significación estadística $p < 0.2$ o que en estudios previos hubiese sido demostrado su valor pronóstico. Para estimar el peso de una variable en el análisis multivariante se calcularon las hazard ratio (HR) o razón de tasas. Se entendió como tiempo hasta el primer tratamiento (TPT), como el periodo de tiempo entre el diagnóstico y la fecha de inicio de tratamiento. La supervivencia libre de progresión (SLP) fue definida como el período de tiempo desde el inicio de la línea terapéutica y la primera recaída/progresión. La supervivencia global (SG) hizo referencia al período de tiempo entre el diagnóstico y la fecha de muerte del paciente o la última fecha de seguimiento registrada, con independencia del estado de la enfermedad. La probabilidad de TPT, SLP o SG fue calculada utilizando el método de Kaplan-Meier. Las comparaciones entre las curvas de supervivencia de los distintos grupos de pacientes se realizaron mediante el test Log-Rank. Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando se observaron valores de p inferiores a 0.05. El coeficiente de correlación, diagramas de Bland-Altman, diferencia de medias y límite de concordancia del 95%, informado como $\pm 1,96$ s.d., se calcularon a partir los datos en porcentaje.

Resultados

4 Resultados

4.1 Características clínico biológicas de los pacientes al diagnóstico y al inicio del tratamiento.

Se realizó un estudio retrospectivo observacional en el que se incluyeron un total de 96 pacientes diagnosticados de LLC según la OMS 2016 (Swerdlow et al. 2016). De todos ellos, 9 pacientes (9%) fueron diagnosticados de LLCP y 87 pacientes (91%) correspondían a diagnóstico de LLC. Cincuenta y nueve (61%) eran hombres, y la mediana de edad al diagnóstico fue de 61 años (rango: 33-92), siendo 38 casos (40%) mayores de 65 años. Con una mediana de seguimiento de 31 meses (RIQ de 0 a 229 meses) entre el diagnóstico y el inicio de tratamiento, la edad aumentó a 65 años (mediana 61 vs 65, $P<0.001$), siendo 47 casos (49%) mayores de 65 años. Las principales características clínicas y biológicas al diagnóstico y al inicio de tratamiento de los pacientes incluidos en el estudio, se detallan en la Tabla 4.3.

Al diagnóstico, 78 pacientes (81%) presentaron un estado general medido por la escala ECOG de 0, 12 (12%) de I con sintomatología leve y 2 casos (2%) con <50% del día encamados (ECOG II). Los síntomas más frecuentes fue la sudoración ($n=6$, 6%), pérdida de peso ($n=5$, 5%), seguida de astenia ($n=3$, 3%) y fiebre ($n=1$, 1%). Al inicio de tratamiento, también la mayoría eran asintomáticos (78, 82%), sin observarse diferencias significativas en la evolución.

Cuarenta y cuatro pacientes (46%) presentaron adenopatías en un territorio ganglionar en el 23%, en dos territorios en el 15% y en tres o más en el 8%; esplenomegalia en un 8% y hepatomegalia en un 3% del total de casos, al momento del diagnóstico. El aumento de las adenopatías fue progresiva (46% vs 78%, $P<0.001$), aumentando hasta el 30% y 29% los casos con dos o tres territorios ganglionares afectados. Además, 29 casos presentaron esplenomegalia (8% vs 30%, $P<0.001$), y 9 (9%) hepatomegalia.

Con respecto a las cifras hematológicas, la mediana basal de hemoglobina, recuento leucocitario total, linfocitario absoluto, y plaquetar fue de 13.75g/dL (RIQ 12.50-14.80g/dL), $19.08\times 10^9/L$ (RIQ 13.45-31.87 $\times 10^9/L$), $13.49\times 10^9/L$ (RIQ 8.26-24.50 $\times 10^9/L$) y $205.00\times 10^9/L$ (RIQ 162.25-231.00 $\times 10^9/L$), respectivamente. Durante la progresión natural de la enfermedad, el valor de la hemoglobina (mediana 13.75 vs 12.30 g/dL, $P<0.001$) y del recuento plaquetar (mediana 205.00 vs $167.50\times 10^9/L$, $P=0.003$), fue significativamente menor, mientras que aumentó la cinética del recuento leucocitario total (mediana 19.08 vs $60.80\times 10^9/L$, $P<0.001$) y linfocitario absoluto (mediana 13.49 vs $53.83\times 10^9/L$, $P<0.001$). Asimismo, los valores bioquímicos de LDH (mediana 351.00 vs 375.00 U/L, $P=0.034$) y B2-microglobulina (mediana 2.46 vs 2.90 mg/dL, $P<0.001$) aumentaron. En concreto, 27

casos (26%) presentaron valores alterados de B2-microglobulina con respecto a los descritos al diagnóstico (rango normal 83% vs 64%; rango elevado 17% vs 36%; $P<0.011$).

Al diagnóstico se recogieron las características inmunofenotípicas imprescindibles para la caracterización diagnóstica, y los valores bioquímicos claves. La mediana de los niveles de creatinina, y de inmunoglobulinas séricas IgG, IgA e IgM, fue de 0.9mg/dL (RIQ 0.70-1.09mg/dL), y 790.00mg/dL (RIQ 573.75-1034.25mg/dL), 127.00mg/dL (RIQ 78.00-211.00mg/dL) y 45.00mg/dL (RIQ 26.00-80.00mg/dL), respectivamente. Los valores de coexpresión de antígenos de superficie CD19/CD5+ fue de 70,50% (RIQ 35.75-90.05%), con mayor expresión de cadenas ligeras Kappa (n=37, 63%), seguidas de Lambda (n=18, 30%) y Kappa/Lambda (n=4, 7%). La expresión de la proteína ZAP70 y CD38, fue positiva en 43 (45%) y 41 pacientes (43%), respectivamente.

Según el sistema de estadificación Rai, 47 (49%) pacientes presentaban enfermedad de bajo riesgo, 34 (35%) en estadio I o II, como enfermedad de riesgo intermedio, y 15 (16%) con enfermedad de alto riesgo. Según el sistema de Binet, se clasificaron en estadio A 78 (81%), 10 (11%) en estadio B, y en minoría en estadio C (8 (8%)). Tras la progresión, la mayoría de los pacientes se reclasificaron en los subgrupos de riesgo intermedio y alto, y estadios B y C, según los sistemas de Rai y Binet (riesgo bajo: 49% vs 7%; intermedio 35% vs 52%; alto 16% vs 39%, $P<0.001$) (estadio A 81% vs 32%; estadio B 11% vs 41%; estadio C 8% vs 27%, $P<0.001$), lo que justificó la necesidad de inicio de tratamiento.

El estudio citogenético fue posible en 94 pacientes (96%) para FISH, y 56 (58%) para cariotipo. Cincuenta y nueve pacientes (63%) mostraron anomalías en el FISH, con la del(13q14) en 35 (37%) como alteración más frecuente, seguida de la trisomía del cromosoma 12 en 19 casos (20%), y la del(11q22) y del(17p13), en 11 (12%) y 7 pacientes (7%), respectivamente. Treinta y ocho (68%) pacientes, presentaron un cariotipo normal, mientras que 16 (29%) mostraron 1 ó 2 anomalías cromosómicas clonales. Un paciente (2%), presentó un cariotipo de complejidad baja con 3 lesiones, y otro (2%) con cariotipo complejo intermedio con 4 (Anexo 2: Tabla 1). Con un aumento discreto de casos con FISH alterado durante la progresión (65, 71%), siguió describiéndose la del(13q14) como la más frecuente (39, 42%). En cambio, las diferencias fueron significativas en las alteraciones cromosómicas detectadas en el cariotipo en 49 casos, de los cuales 25 (51%) presentaron alteraciones cromosómicas, con una o dos lesiones (43%), complejidad baja (2%), intermedia (4%) y alta (2%) ($P<0.001$) (Anexo 2: Tabla 1).

Se identificaron 61 (63%) pacientes con estado mutacional U-LLC, 29 (30%) M-LLC, y 6 casos (6%) con el reordenamiento específico IGVH3-21 (Tabla 4.5). Mediante secuenciación Sanger, se amplificaron un total de 105 reordenamientos IGVH con ADN como muestra de partida, de los cuales 9 (9%) fueron no productivos y no detectados a partir de ADNc. Nueve (9%) casos presentaron doble reordenamiento, uno de ellos no productivo.

La familia de genes *VH3* (44%) fue la más representada, seguida de *VH1* (31%) y *VH4* (21%); en concreto los subtipos IGVH1-69 (18%), IGVH4-34 (7%), y en igualdad IGVH3-21-IGVH3-30-IGVH3-23 (6%); mientras que la familia *VH2* (2%), *VH5* y *VH6* (1% en ambos casos), fueron minoritarias. En el caso de *DH* y *JH*, la familia DH3-3 (15%) y JH6 (45%) formaban parte del reordenamiento en la mayoría de los casos. Cuatro pacientes (4%) presentaron reordenamientos IGVH-IGDH-IGJH estereotipados, asignados a dos de los subtipos mayoritarios, CLL#2 (3, 3%) y CLL#1 (1, 1%). Cuatro casos más, fueron reagrupados en cuatro minoritarios (CLL#3, 1%; CLL#6, 1%; CLL#28A, 1%; CLL#77, 1%). Todos ellos tenían diagnóstico de LLC, mientras que el CLL#28A era LLCP (Anexo 2: Tabla 2).

4.1.1 Análisis de calidad de secuenciación y cobertura en las muestras basales.

El porcentaje mapeado *on-target* fue >85%, y se examinó la uniformidad y distribución de la cobertura mínima y media de cada gen (Anexo 1: Figuras 4). Siendo la media de la cobertura media 19670,60x por gen (2782,33 - 33536,25x), 6 de los 11 genes a estudio presentaron una cobertura igual o superior a este umbral: los genes *EGR2* (33.536,25x) *NOTCH1* (27.318,00x) y *POT1* (25.898,13x), con una cobertura global superior al resto, mientras que el gen *ATM* mostraba menor cobertura (2.782,33x) (Tabla 4.1). A pesar de ello, el exón 1 del gen *EGR2* y en algunas regiones del gen *ATM* (exón 1, 21, 33 y 54), no se superaba 500x de cobertura.

Gen	Exón	Número amplicones	Cobertura mínima (Media)	Cobertura media (Media)
<i>TP53</i>	11	19	9.154,59	10.193,23
<i>BIRC3</i>	6-9	9	8.985,63	11.782,69
<i>NOTCH1</i>	34	15	23.281,00	27.318,00
<i>MYD88</i>	5	2	12.384,25	12.646,50
<i>SF3B1</i>	14-16	7	6.531,00	7.536,08
<i>NFKBIE</i>	1	8	20.451,00	21.591,00
<i>XPO1</i>	14-16	5	20.041,67	20.339,17
<i>EGR2</i>	1-2	14	31.731,00	33.536,25
<i>FBXW7</i>	8-12	12	19.451,00	19.670,60
<i>POT1</i>	6-9	10	25.079,75	25.898,13
<i>ATM</i>	1-41, 43-62	126	2.445,90	2.782,33

Tabla 4.1 Cobertura mínima y media total de cada gen a estudio.

Más del 90% de los casos estudiados, presentaron una cobertura media $\geq 1000x$ en el panel TP53 (92.35%) y paneles OG-CLL (90.00%) y OG-CLL2 (92.85%). En particular, dada la inferior calidad de cobertura del gen *ATM*, el 88.86% de los casos tenían la región a estudio cubierta $\geq 500x$ (Tabla 4.2) (Anexo 1: Figuras 1).

Panel	Media Casos cobertura media $\geq 1000x$ (%)	Media Casos cobertura media $\geq 500x$ (%)	Media Casos cobertura media $\geq 250x$ (%)	Media Casos cobertura media $< 250x$ (%)
<i>TP53</i>	92.35	2.54	2.63	2.47
<i>OG-CLL</i>	90.70	5.80	2.42	1.09
<i>OG-CLL2</i>	92.85	2.60	1.37	3.18
<i>ATM</i>	78.88	9.98	4.69	6.43

Tabla 4.2 Porcentaje de casos con una cobertura media por panel de $\geq 1000x$, $\geq 500x$, $\geq 250x$ y $< 100x$, respectivamente.

Características demográficas	Categoría	Datos al diagnóstico	Datos pretratamiento	p-valor
Edad (años), media (RIQ)		61 (33-92)	65 (36-97)	<0.001
Sexo (masculino), n (%)		59 (61,50)		
Parámetros clínicos				
>65 años, n (%)		38 (40)	47 (49)	0.245
ECOG performance status, n (%)	0	78 (81)	79 (82)	1.000
	1	12 (12)	12 (13)	
	2	2 (2)	2 (2)	
Síntomas B, n (%)		7 (7)	9 (9)	0.777
Sudoración, n (%)		6 (6)	ND	
Pérdida de peso, n (%)		5 (5)	ND	
Astenia, n (%)		3 (3)	ND	
Fiebre, n (%)		1 (1)	ND	
Linfoadenopatías (territorios), n (%)		43 (45)	75 (78)	<0.001
	1	22 (23)	19 (20)	
	2	14 (15)	29 (30)	
	3	8 (8)	28 (29)	
Esplenomegalia, n (%)		8 (8)	29 (30)	<0.001
Hepatomegalia, n (%)		3 (3)	9 (9)	
Cifras analítico-hematológicas				
Hemoglobina, Mediana (RIQ), g/dL		13.75 (12.50-14.80)	12.30 (10.77-13.70)	<0.001
Leucocitos totales, Mediana (RIQ), $\times 10^9/L$		19.08 (13.45-31.87)	60.80 (31.64-119.39)	<0.001
Neutrófilos absolutos, Mediana (RIQ), $\times 10^9/L$		4.54 (3.32-5.85)	4.20 (2.77-5.68)	0.665
Linfocitos absolutos, Mediana (RIQ), $\times 10^9/L$		13.49 (8.26-24.50)	53.85 (23.86-112.24)	<0.001
Plaquetas, Mediana (RIQ), $\times 10^9/L$		205.00 (162.25-231.00)	167.50 (119.25-215.25)	0.003
Análisis de bioquímica				
Creatinina, Mediana (RIQ), mg/dL		0.90 (0.70-1.09)	ND	
IgG, Mediana (RIQ), mg/dL		790.00 (573.75-1034.25)	ND	
IgA, Mediana (RIQ), mg/dL		127.00 (78.00-211.00)	ND	
IgM, Mediana (RIQ), mg/dL		45.00 (26.00-80.00)	ND	
Lactato deshidrogenasa (LDH), Mediana (RIQ), U/L		351.00 (288.50-394.00)	375.00 (308.50-484.50)	0.034
LDH elevado (>1x superior al límite normal), n (%)		14/92 (15)	24/92 (26)	0.101
$\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2$), Mediana (RIQ), mg/dL		2.46 (1.87-6.01)	2.90 (2.40-4.42)	<0.001
$\beta 2$ elevado (>1x superior al límite normal), n (%)		15/86 (17)	27/74 (36)	0.011
Estadificación				
Estadio Rai, n (%)	0	47 (49)	7 (7)	<0.001
	I-II	34 (35)	52 (54)	
	III-IV	15 (16)	37 (39)	
Estadio Binet, n (%)	A	78 (81)	31 (32)	<0.001
	B	10 (11)	39 (41)	
	C	8 (8)	26 (27)	
Características inmunofenotípicas				
Coexpresión CD19+/CD5+ (%), Mediana (RIQ)		70.50 (35.75-90.05)	ND	
Cadenas ligeras, n (%)	Kappa	37 (63)	ND	
	Lambda	18 (30)	ND	
	Kappa/Lambda	4 (7)	ND	
ZAP70 >20% positivo, n (%)		43/66 (65)	ND	
CD38 >30% positivo, n (%)		41/82 (50)	ND	
Estudio citogenético				
Alteración en el número de copias (FISH), n (%)		59/94 (63)	65/92 (71)	0.573
	del(13q14)	35 (37)	39 (42)	
	trisomía 12	19 (20)	19 (21)	
	del(11q22)	11(12)	14 (15)	
	del(17p13)	7 (7)	8 (9)	
Cartiotipo normal, n (%)		38/56 (68)	24/49 (49)	<0.001
	1-2 lesiones	16 (29)	21 (43)	
	Complejidad baja 3	1 (2)	1 (2)	
	Complejidad intermedia 4	1 (2)	2 (4)	
	Complejidad alta 5	0 (0)	1 (2)	

Tabla 4.3 Principales características clínicas y biológicas de 96 pacientes con LLC a estudio. (RIQ: rango intercuartil; ND: no determinado).

4.1.2 Comparación del estado mutacional IGVH por Sseq y NGS.

La media de secuencias analizadas por paciente fue 41642 (rango, 224-534346). El recuento medio de secuencia única más abundante fue 7697 (rango, 172-431926), mientras que el de todos los clonotipos (la suma de todas las secuencias únicas con exactamente el mismo reordenamiento VDJ pero con diferencia en longitud o porcentaje de mutaciones) fue 22921 (rango, 174-330175). La mediana de cobertura de la región VH fue del 99.70% (rango, 87.59-100). Se detectaron los mismos reordenamientos clonales (105) que los determinados por Sseq, 9 no productivos, con un porcentaje de lecturas mapeadas en el gen V que varió de 17.94 a 99.78%.

Tras la detección y caracterización de los clones mayoritarios, fue necesario establecer un límite confiable para los clones menores. Se calcularon los ratios de lecturas mapeadas entre clones consecutivos, y se determinó un límite de diferencia ≥ 5 entre ratios, para considerar el reordenamiento como clonal intramuestra. Con esta clasificación, las muestras se etiquetaron como subclonal o "N clonal" (siendo N el número de posibles clones de LLC). El valor promedio de la máxima diferencia detectada fue 347 (raango, 125 – 398x) y 92 veces (rango, 21 – 149x) en los grupos con una única clonal (1 clon) y doble reordenamiento (2 clones), respectivamente (Anexo 1: Figuras 2). En base a esta clasificación, se detectaron 6 pacientes, con un reordenamiento extra, categorizados como "2 clonas", siendo el porcentaje de lecturas mapeadas en el gen V no superior al 11% en estos casos (7.84-11.96%). Cuatro de estos seis reordenamientos, fueron no productivos, con codones stop detectados en la región CDR3, y todos ellos presentaron SMH (%) afines a la categorización del clonotipo principal. El 50% de los nuevos reordenamientos, pertenecían a la misma familia VH que el clon mayoritario, lo que, además de por su baja proporción clonal, dificultó su resolución por la técnica convencional (Tabla 4.4).

Caso	Estado mutacional global	Homología (%)	IGVH	IGDH	IGJH	% Total de lecturas	Productividad
LLC-33	NO MUTADO	100	IGVH4-4	IGDH2-2	IGJH6	89.87	Sí
		99.70	IGVH4-61	IGDH2-8	IGJH6	9.37	No
LLC-43	NO MUTADO	100	IGVH3-11	IGDH3-16	IGJH4	69.10	Sí
		99.67	IGVH3-23	IGDH5-5	IGJH5	7.84	No
LLC-52	NO MUTADO	100	IGVH1-69	IGDH3-3	IGJH2	77.70	Sí
		100	IGVH3-22	IGDH2-8	IGJH4	11.96	Sí
LLC-58	NO MUTADO	99.51	IGVH3-9	IGDH6-6	IGJH4	79.42	Sí
		98.40	IGVH2-5	IGDH2-8	IGJH4	10.42	No
LLC-6	NO MUTADO	100	IGVH1-2	IGDH3-3	IGJH1	70.80	Sí
		99.70	IGVH1-69	IGDH3-9	IGJH3	11.72	Sí
LLC-60	NO MUTADO	100	IGVH3-11	IGDH6-19	IGJH1	81.56	Sí
		99.70	IGVH2-5	-	IGJH6	10.43	No

Tabla 4.4 Listado de dobles reordenamientos detectados por NGS y no por Sseq.

Los reordenamientos IGVH obtenidos por SSeq, se compararon con los obtenidos por NGS en términos de genes IGVH, IGJH, IGDH, estado mutacional y CDR3: 105/105 (96 reordenamientos predominantes y 9 secundarios). Los genes IGVH e IGJH, se detectaron por igual (incluyendo diferencias

en alelo) (100%). En el caso de los genes IGDH, 98/98 fueron identificados idénticos (incluyendo diferencias en alelo), mientras que por NGS se pudo completar el reordenamiento en 4/6 casos más, sin DH establecido por Sseq, siendo los dos casos restantes, reordenamientos VH3-21. La secuencia de aminoácidos fue igual en 93/100 reordenamientos con CDR3 disponible por Sseq (93,10%), 7/100 con 1 aminoácido diferente (7%).

Tal y como mostró el gráfico de dispersión y el gráfico de Bland-Altman, para la determinación del estado de IGVH, las técnicas Sseq y NGS fueron concordantes en el 99,04% de los casos (104/105), con una excelente correlación con el porcentaje de identidad (homología %) detectado (linealidad=0.748, $P<0.001$) (Figura 4.1 a) y b)). La única discrepancia se asignó a un paciente bclonal mutado (LLC-10), con un reordenamiento productivo (IGVH1-69/IGDH3-10/IGJH2, 91.66%) y otro no productivo (IGVH3-23/IGDH1-14/IGJH2, 84.94%), con una homología por NGS del reordenamiento no productivo del 98.60%, no mutado, mientras que el clon principal permanecía mutado (97.60%). En 3 casos más, las secuencias NGS fueron más cercanas a la línea germinal, sin implicar un cambio en la categorización del estado mutacional IGVH, lo que sugirió un probable error acumulado por la técnica SSeq.

En base a este ratio, y al recuento linfocitario absoluto (RLA, $\times 10^9/L$) en sangre periférica, se determinó la proporción de células LLC hipotéticas en tanto por cien [cellLC(%)], y se extrapoló en base al recuento leucocitario ($\times 10^9/L$) total. De esta manera, se obtuvo el valor (%) de células LLC con respecto a los leucocitos totales. Con tal de conocer la validez de estos resultados, se comparó el cellLC(%) con el valor de co-expresión de antígenos de superficie CD19/CD5+ (%) de 87 muestras. En este caso, se observó una excelente correlación entre el porcentaje de células LLC en función del cálculo clonotípico por NGS, y el del fenotipo por citometría de flujo (linealidad=0.688, $P<0.001$), con una mediana de diferencia porcentual de 3.45 (rango 0.62-6.00). En los casos con doble reordenamiento, la suma de cellLC(%) derivada de cada clonotipo, se correlacionó con el valor CD19/CD5+ (%), a excepción de un caso (LLC-63). Con respecto al resto de muestras con doble reordenamiento, el fenotipo fue consistente con una única población monoclonal.

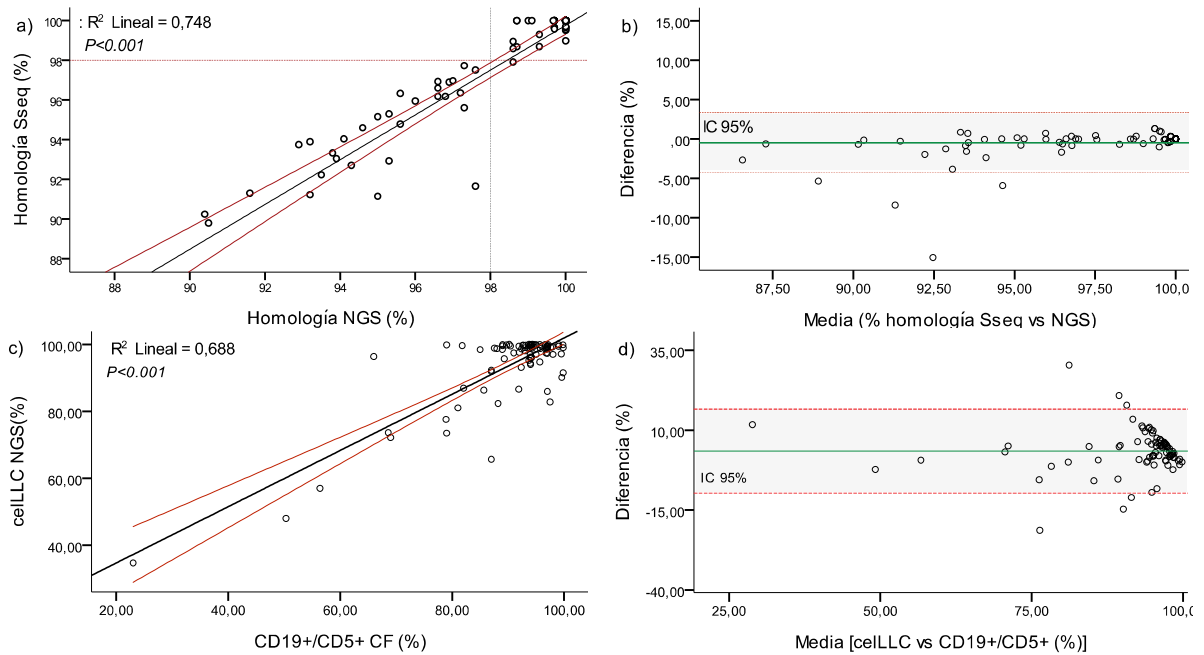


Figura 4.1 Comparación entre el porcentaje de identidad (homología %) de IGVH detectada por Sseq y NGS, y la proporción de células LLC en base al clonotipo por NGS. Correlación de Pearson (a) y gráfico de Bland-Altman (b) entre los métodos Sseq y NGS (linealidad = 0.748; coeficiente de correlación de Pearson $R=0.865$, $P<0.001$). Correlación de Pearson (c) y gráfico de Bland-Altman (d) entre el porcentaje de cellLLC por NGS y el valor CD19+/CD5+ detectado por CF (linealidad = 0.688; coeficiente de correlación de Pearson $R=0.865$, $P<0.001$) (cellLLC: células LLC detectadas por NGS; CF: citometría de flujo; IC: intervalo de confianza).

4.1.3 Heterogeneidad clonal y composición subclonal.

En 82 de los 93 (88%) pacientes evaluados, se identificaron un total de 342 variantes, mientras que en 11 (12%) no se detectó ninguna alteración genética. En base al significado clínico de las variantes, 228 (67%) fueron benignas, 16 (5%) probablemente benignas, 23 (7%) de significado incierto, 52 (15%) probablemente patogénicas y 23 (7%) patogénicas (Figura 4.2).

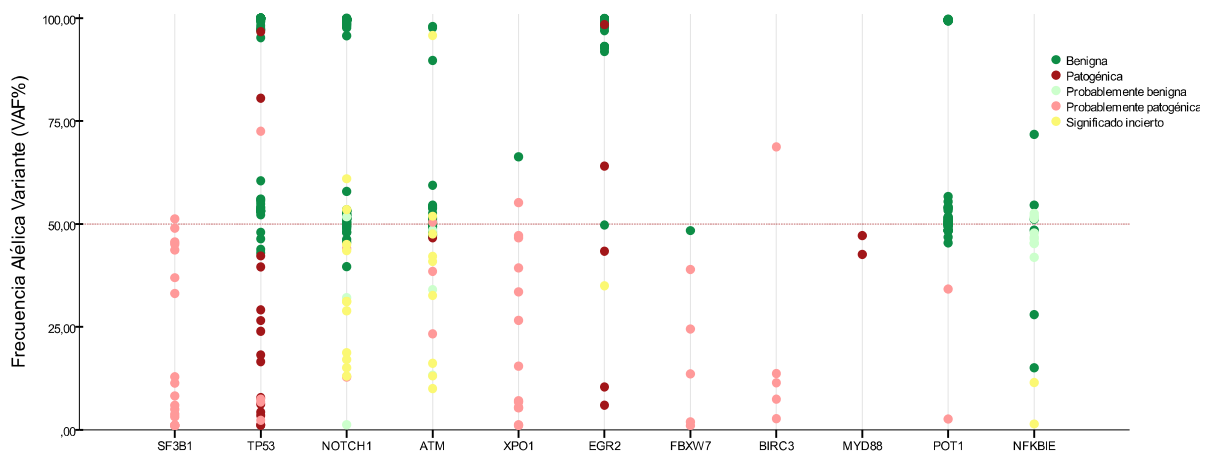


Figura 4.2 Clasificación de las variantes reportadas según su frecuencia alélica de la variante (VAF%) y significado clínico. Verde: benigna; verde claro: probablemente benigna; amarillo: significado incierto; rosa: probablemente patogénica; rojo: patogénica.

Una vez descartadas las 244 (71%) mutaciones de significado clínico benigno y probablemente benigno (Anexo 2: Tabla 4), centramos el estudio en las 98 (29%) mutaciones con potencial valor clínico

que se reportaron en 53 (57%) pacientes, siendo la mediana del número de variantes detectadas por paciente de 1, variando de 0 a 5. Veintisiete casos (29%) presentaron una mutación, 15 (16%) dos variantes, 6 (6%) con tres, 2 (2%) con cuatro y en 3 (3%) con cinco variantes. En 40 (43%) pacientes, no se detectó ninguna mutación. Respecto a la naturaleza de las mutaciones, las más frecuentes fueron las de tipo *missense* (64, 65%), *frameshift* (22, 23%), *nonsense* (7, 7%) y por último variantes en regiones de splicing, *splice site* (5, 5%).

En relación a la frecuencia alélica de las variantes, las mutaciones clonales (≥ 10 VAF%) fueron las más frecuentes en 45 (48%) pacientes. Se presentaron como variantes únicas en 31 casos (33%), y en asociación con una mutación subclonal (VAF <10%) en 14 (15%). Ocho pacientes (9%), presentaron mutaciones subclonales aisladas, de los cuales, 2 (2%) eran variantes subclonales de alta frecuencia (VAF $\geq 5\%$), y 6 (6%) subclonales de baja frecuencia (VAF <5%) (Figura 4.3).

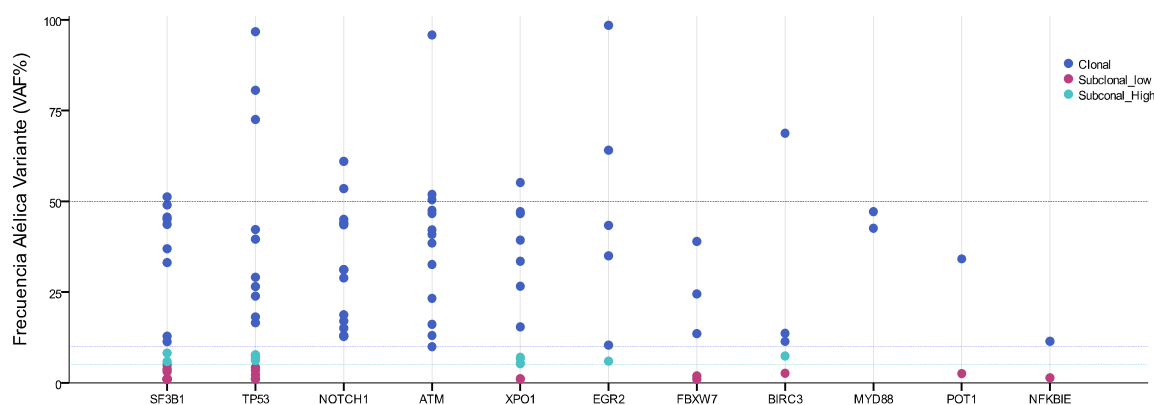


Figura 4.3 Clasificación de las variantes reportadas según su frecuencia alélica de la variante (VAF%) en clonales, subclonales de alta carga y subclonales de baja carga. Azul: clonal; Azul claro: subclonal alto; Morado: subclonal bajo.

4.1.4 Mutaciones genéticas y vías celulares más frecuentemente alteradas.

La fracción alélica mutacional mínima observada en todos los casos fue de >1% en los genes a estudio. Las mutaciones de naturaleza *missense* fueron las variantes más frecuentes en los genes *SF3B1*, *TP53*, *XPO1* y *ATM*, mientras que la mayoría de las mutaciones en *NOTCH1* y en su totalidad en *BIRC3*, lo eran de tipo *frameshift*. Las mutaciones clonales y subclonales (VAF <10%) mostraron características moleculares y distribución genética similar, a excepción de los genes *ATM*, *MYD88* y *NOTCH1*, en los que únicamente se hallaron variantes clonales (Figura 4.4). Se observó una evolución mutacional convergente en 13 pacientes (*TP53*, 3; *SF3B1*, 3; *ATM*, 3; *XPO1*, 3; *BIRC3*, 1).

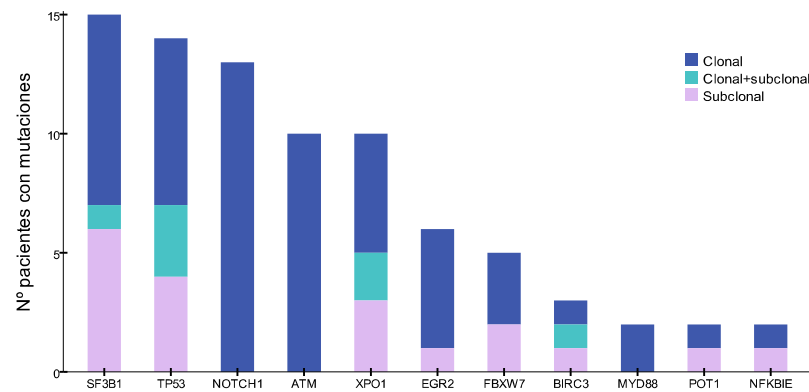


Figura 4.4 Número de mutaciones encontradas en la serie de pacientes global. Azul: clonal; Azul claro: subclonal alto; Morado: subclonal bajo.

Según la categoría funcional, las mutaciones que afectan a la respuesta al daño en el ADN fueron las más frecuentes (34, 35%), seguidas de las variantes en los genes implicados en el *splicing*, transcripción y transporte del ARN (31, 32%), de la vía de señalización de NOTCH (18; 18%), y de las vías de señalización del BCR/TLR (15, 15%) (Anexo 2: Tabla 5).

Entre los genes implicados en la respuesta al daño en el ADN, el gen *TP53* fue el gen mutado en mayor frecuencia, con un total de 19 mutaciones en 14 pacientes (15%). Las mutaciones encontradas afectaron principalmente al dominio de unión al ADN, codificado, entre otros, por los exones 5, 7 (n=5, 52% en ambos casos) y 6 (n=4, 21%). Catorce variantes (68%), fueron de tipo *missense*, 3 *frameshift* y 3 *nonsense* (32%), de las cuales 10 eran clonales con una VAF $\geq 10\%$. Una mutación subclonal en el gen *TP53*, fue la única aberración genética detectada en un paciente (LLC-77), y en concurrencia con otras mutaciones genéticas en 11 de los 14 casos (79%). En 2 pacientes (14%) se halló dos mutaciones en *TP53* de manera concomitante, siendo una de ellas subclonal, con un VAF $< 5\%$. En otro caso más (LLC-49), se detectaron cuatro mutaciones, cada una de ellas localizadas en un exón diferente, con una carga clonal y tres subclonales que no superaron el VAF $< 7\%$.

El gen *ATM* fue el segundo gen con mayor índice mutacional implicado en esta vía, a pesar de que sólo fue posible su determinación en el 55% de la serie (n=51). Se detectaron 13 mutaciones en 10 pacientes (11%), todas ellas clonales, localizadas a lo largo del gen, de las cuales 7 (54%) eran *missense*, 4 (31%) en la región de *splicing*, y 2 (15%) de tipo *nonsense*. En 3 pacientes (23%) se describió una mutación clonal única en *ATM*, mientras que en 3 casos más (23%), se detectaron dos mutaciones genéticas independientes adquiridas en el mismo gen, en asociación con mutaciones puntuales en otros genes en dos de ellos.

Por último, el gen *POT1*, se vió afectado minoritariamente, detectándose dos mutaciones en dos pacientes (2%). La inserción clonal se localizaba en el exón 6 del gen, y en asociación con otra mutación clonal en el gen *TP53*; mientras que la *missense* subclonal, en el exón 9, se detectó de manera aislada en el paciente LLC-78.

En cuanto a los genes involucrados en la transcripción del ARN, el gen de splicing *SF3B1* fue el segundo gen con mayor índice mutacional, encontrándose 18 variantes en 15 de los 93 pacientes (16%) analizados, con carga clonal y subclonal de manera proporcional (9, 50%). Todas las variantes fueron de naturaleza *missense*, localizadas en los exones 14 (n=6, 33%), 15 (n=10, 56%) y 16 (n=2, 11%), entre las que destacó la mutación recurrente p.Lys700Glu, en seis pacientes (40%). La presencia de una mutación en *SF3B1* fue la única aberración genética detectada en 8 pacientes (53%), siendo en 3, mutaciones subclonales que no superaron VAF>1,5%. En 3 pacientes (20%) se hallaron dos mutaciones de *SF3B1* en ausencia de aberraciones genéticas asociadas, dos de los cuales con cargas subclonales <8%.

El gen *XPO1*, fue el segundo gen de *splicing* mutado con mayor frecuencia, encontrándose 13 mutaciones en 10 de los 93 pacientes (11%) analizados, 54% de ellas clonales. Todas las variantes fueron de tipo *missense* (12, 92%), menos una de naturaleza *frameshift* (8%), localizadas en su mayoría en el exón 15 (10, 77%) y exón 16 (3, 23) del gen. La mutación más común, presente en 9 pacientes (90%), daba lugar a una alteración de la proteína en el codón 571, principalmente por el cambio de aminoácido p.Glu571Lys (n=7, 70%), seguida de p.Glu571Val en 2 pacientes (15%). Sólo el paciente LLC-73, presentó la mutación p.Glu571Lys aislada, mientras que en los 9 casos restantes, se detectaron las mutaciones en *XPO1* en concurrencia con mutaciones que afectaron a uno (4, 40%), dos (1, 10%), e incluso tres (2, 20%) genes diferentes relacionados con la LLC, y en 3 pacientes más, en combinación con otra variante subclonal (2, 20%), y otra clonal (1, 10%) en el gen *XPO1*.

Entre los genes mutados que afectan a la vía de señalización de NOTCH, 13 variantes clonales se encontraron en el gen *NOTCH1* en 13 casos diferentes (14%), con una frecuencia mutacional clonal en todos ellos. La mayoría de las mutaciones comprometían la funcionalidad de la proteína, 10 *frameshift* (77%), 2 *nonsense* (15%), y 1 *missense* (8%), siendo la más frecuente la indel p.Pro2514fs*4 (77%), localizada en el dominio PEST C-terminal del gen. Sólo 5 pacientes (39%) presentaron una única mutación en *NOTCH1*, mientras que los 8 restantes en asociación con una (3 casos, 23%), dos (2 casos, 15%), tres (2 casos, 15%) e incluso cuatro (1 caso, 8%) alteraciones genéticas.

Con respecto al estado mutacional de *FBXW7*, sólo se identificaron 5 mutaciones en 5 pacientes de la serie global (5%), 3 clonales (60%) y 2 subclonales (40%). Todas las variantes fueron de tipo *missense*, concentradas en el exón 9 (40%) y 10 (60%) del gen, con una prevalencia del cambio de aminoácido p.Arg505Leu en dos de los 5 pacientes descritos (40%). A excepción del paciente LLC-93, todas las mutaciones en *FBXW7* fueron detectadas en asociación con otras variantes genéticas (90%).

En la serie global, los genes involucrados en las vías de señalización BCR/TLR, presentaron menor índice mutacional que el resto de genes implicados en el perfil genético de la LLC. En concreto, 6 variantes en 6 pacientes diferentes (6%) se detectaron en el gen *EGR2*, 5 clonales (83%) y 1 subclonal

(17%), alterando parcialmente la vía de señalización NFκB. Cinco de las mutaciones de *EGR2* (83%), se localizaron en el exón 2, afectando predominantemente a los codones p.Glu356 (3, 50%) y p.Asp411 (2, 33%). Las mutaciones en *EGR2*, se presentaron de forma aislada (5, 83%), menos en el caso LLC-15 que fue en asociación con una mutación clonal *frameshift* en el gen *TP53*.

El segundo componente genético mayormente mutado e involucrado en la vía de señalización NFκB, fue el gen *BIRC3*, en el que se detectaron 5 mutaciones en 3 pacientes (3%), descritas como deleciones e inserciones que oscilaron entre 1 y 13 nucleótidos. Todas las mutaciones fueron *frameshift*, agrupadas en dos regiones *hotspot* comprendidas entre los aminoácidos 429-434 detectadas a un VAF<10% (2, 40%), y los aminoácidos 547-554 con una frecuencia clonal (3, 60%). Una deleción clonal en *BIRC3*, fue la única aberración genética en dos pacientes (67%), mientras que en el caso LLC-14, concurren 2 deleciones clonales con una inserción subclonal en el gen *BIRC3*, en asociación con dos mutaciones *missense* clonales en otros dos genes. Respecto al gen *NFKBIE*, se identificó la misma deleción en dos pacientes diferentes (2%), en la región *hotspot* p.Tyr254.

Por último, la mutación p.Leu265Pro más recurrente en el gen *MYD88*, componente clave en la señalización intracelular del complejo TLR, se identificó en dos pacientes de la serie (2%), ambas en heterocigosis, una de ellas como marcador genético único alterado en el LLC-99, y en el LLC-24 en asociación con una mutación *missense* clonal en el gen *TP53*.

4.1.5 **Coexistencia/exclusividad de las variantes genéticas y su correlación con las características clínico biológicas.**

La integración de las mutaciones genéticas con las características fenotípicas y/o citogenéticas de LLC, reveló algunas asociaciones significativas descritas a continuación (Anexo 2: Tabla 6) (Figura 4.5). La presencia de mutaciones en *TP53* se asoció mayoritariamente con el U-LLC ($P<0.05$), y según los datos citogenéticos disponibles, 4 casos con *TP53_{mut}*, mostraron del(17p13), en 8 se observó mutación en ausencia de deleción, y en 4 casos más la deleción en ausencia de mutación ($P<0.01$). La presencia de alteraciones bien por deleción o/y mutación de *TP53* en estos 16 pacientes (17%), se correlacionó con valores altos de B2-microglobulina ($P=0.038$), mutaciones concurrentes en el gen *NOTCH1* ($P=0.017$), y en general, con la presencia de >2 mutaciones genéticas ($P<0.001$). Además, 2 de los 4 pacientes con cariotipo complejo, también mostraron del(17p13) ($P= 0.053$).

Según los datos citogenéticos, 6 pacientes portaron del(11q22), 2 de los cuales junto con una mutación clonal en *ATM*, y en 6 casos más, con mutación aislada en ausencia de deleción, sin llegar a mostrar una correlación significativa ($P= 0,250$). En cambio, la presencia de trisomía 12, o de mutaciones en *SF3B1*, mostró una correlación negativa con la del(13q14) ($P=0.018$ y $P<0.010$, respectivamente), mientras que en 5 casos con alteración en el gen *EGR2*, sí se detectó la deleción ($P<0.05$). Además, las

mutaciones en el gen *EGR2*, se describieron en pacientes jóvenes ($P=0.04$), y en su totalidad en mujeres ($P=0.003$). En cambio, 12 de los casos con mutaciones en *NOTCH1* eran hombres ($P<0.01$).

El 90% de los pacientes con mutación en *XPO1*, presentó U-LLC ($P= 0.110$), y en asociación con mutaciones en el gen *NFKBIE* ($P=0.01$). Los 3 casos con deleciones en el gen *BIRC3*, mostraron niveles atípicos de LDH ($P= 0.016$).

En general, la presencia de >2 mutaciones genéticas se asoció con características agresivas de LLC como U-LLC ($P<0.033$), *ZAP70* ($P=0.030$) y niveles elevados de LDH ($P=0.053$), siendo los genes mutados más frecuentemente asociados a otras alteraciones genéticas, el gen *NOTCH1* ($P=0.007$), *BIRC3* ($P=0.020$), *TP53* ($P<0.001$), *XPO1* ($P<0.001$), *FBXW7* ($P=0.021$), y *ATM* (7 vs 3, $P=0.010$), y parcialmente el gen *SF3B1* ($P=0.077$) y *NFKBIE* ($P=0.076$).

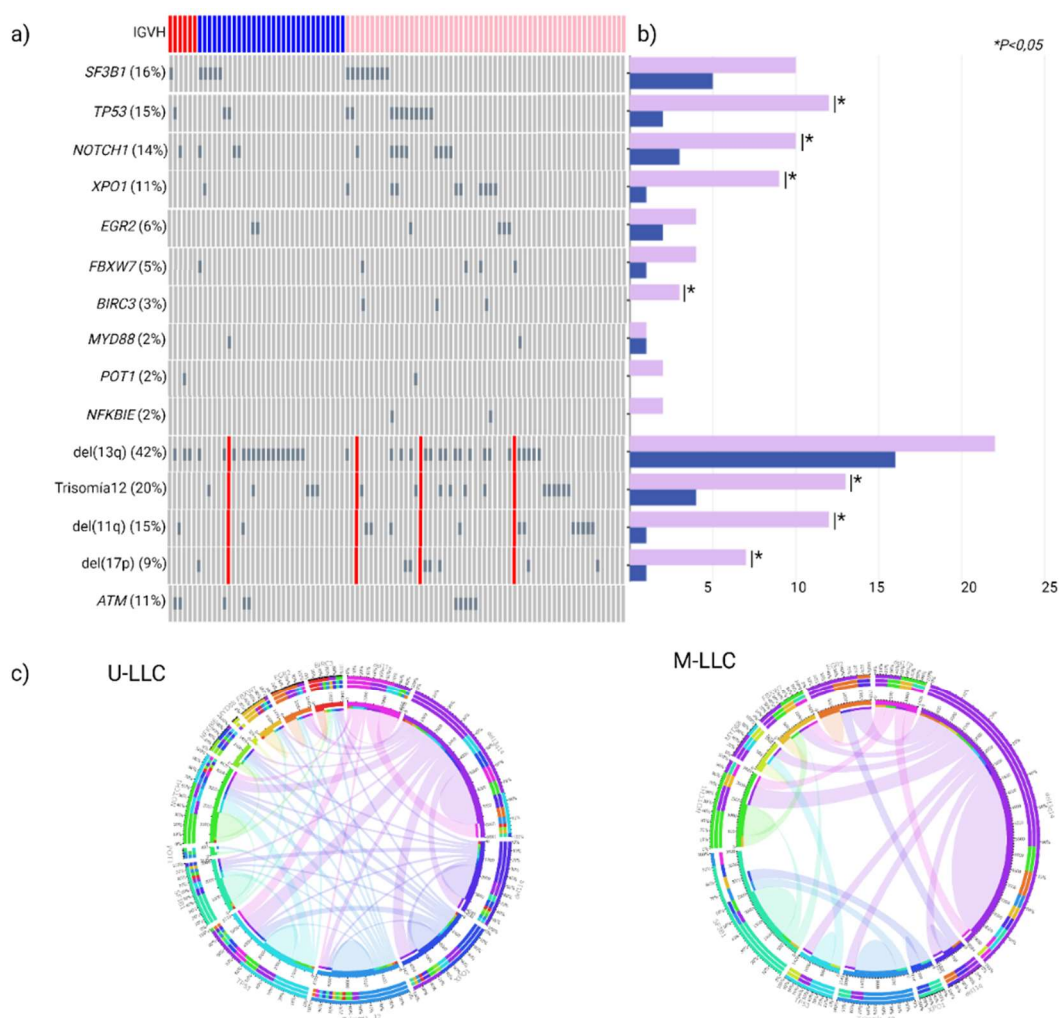


Figura 4.5 Incidencia y distribución de mutaciones en los 11 genes y marcadores genéticos analizados en la cohorte. a) Las filas corresponden a genes secuenciados y características genéticas; las columnas representan pacientes individuales con LLC. Código de color: IGVH: rojo, IGVH3-21; azul; IGHV mutado; rosado: IGHV no mutado. Alteraciones genéticas: gris oscuro, alteración o mutación; gris claro: no mutado o alterado; rojo: no determinado (Figura realizada con la herramienta oncoprint en cBioPortal). b) Frecuencia mutacional según los subgrupos de IGVH U-LLC (rosado) y M-LLC (azul) ($*P<0,05$). c) Representación en circos plot que muestra la complejidad genética diferencial entre U-LLC (izquierda) y M-LLC (derecha).

4.2 Perfil molecular según los grupos de riesgo LLC-IPI e impacto clínico en el TPT.

De acuerdo a la estratificación LLC-IPI los pacientes fueron agrupados 17 casos (18%), 32 (33%), 31 (33%), y 13 (14%), en los grupos de riesgo bajo, intermedio, alto y muy alto respectivamente (Tabla 4.5). Según el número medio de variantes, se observó cómo los grupos de riesgo bajo e intermedio, presentaron como máximo 2 y 3 variantes, en comparación con los grupos de riesgo alto/muy alto que mostraron 4 (n=2, 2%) ó 5 mutaciones (n=3, 3%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P=0.002$). Según el espectro mutacional, se confirmó una mayor frecuencia mutacional en la vía de alteración de la respuesta al daño en el ADN ($TP53_{mut}$ 14/14, $P<0.0001$) y en la señalización de NOTCH ($NOTCH1_{mut}$ 11/13, $P<0.05$) en los casos de alto/muy alto riesgo. Además, tal y como se esperaba, dichos grupos presentaron además, una mayor tasa de factores biológicos adversos, como U-LLC (34/58, $P<0.011$), con del17p o/y $TP53_{mut}$ (18/18, $P<0.0001$), cariotipo complejo (4/4, $P<0.018$), y valores atípicos de B2-microglobulina (32/42 $P<0.0001$). En cambio, el 55% de los casos de bajo riesgo, eran M-LLC (16/29), mientras que el reordenamiento VH3-21, no se asoció a ningún grupo en particular.

Estudio molecular	Categoría	Datos pretratamiento
Reordenamiento único IGVH, n (%)		88 (91)
Doble reordenamiento IGVH, n (%)		8 (9)
Estado mutacional IGVH, n (%)	No mutado	61 (63)
	Mutado	29 (30)
	IGVH3-21*	6 (6)
Mut $TP53$, n (%)		14 (15)
Mut $TP53$ y/o del(17p13), n (%)		16 (17)
Índice Pronóstico (LLC-IPI), n (%)		93/96
	Bajo	17 (18)
	Intermedio	32 (34)
	Alto	31 (33)
	Muy Alto	13 (14)

Tabla 4.5 Variables moleculares e Índice pronóstico LLC-IPI de la serie a estudio.

En segundo lugar, se analizó el potencial impacto de las diversas variables clínico biológicas en el tiempo hasta el primer tratamiento (TPT). La mediana de dicho parámetro (mTPT) para la globalidad de la serie, fue de 46 meses (rango 0 - 215). Para evaluar las asociaciones entre las características de los pacientes y la mTPT, se realizó un análisis univariable con cada una de las siguientes variables: sexo, edad (>65a años), estadio Binet (A y B+C), B2-microglobulina, estado mutacional IGVH, reordenamientos estereotipados, aberraciones citogenéticas, cariotipo complejo, alteraciones genéticas presentes al menos en el 5% de los pacientes ($NOTCH1$, $SF3B1$, $TP53$, $XPO1$, $EGR2$, $FBXW7$ y ATM), número de mutaciones genéticas detectadas, y grupos de riesgo según LLC-IPI (Tabla 4.6).

Los pacientes mayores de 65 años, requirieron de intervención terapéutica con anterioridad (mTPT 153.0 vs 215.0 meses, HR 9.65; IC 95% [2.06, 45.15]; $P=0.004$) (Figura 4.6 a)), al igual que los pacientes con valores atípicos de $\beta 2$ microglobulina (mTPT 153.0 vs 215.0 meses, HR 3.52; IC 95% [0.93,

13.29]; $P=0.063$). En base al estadio clínico de BINET, se observaron diferencias significativas entre los casos con estadio A y B+C, (mTPT 215.0 vs. 127.0 meses, HR 2.54; IC 95% [1.05, 6.13]; $P=0.037$).

Según el índice pronóstico LLC-IPI, se observó una menor mTPT en los casos con riesgo alto/muy alto con respecto a los pacientes de intermedio, y bajo riesgo (mTPT 127.0 vs NA vs 215.0 meses, HR 4.43; IC 95% [1.42, 13.86]; $P=0.010$) (Figura 4.6 d)). Respecto al estado mutacional de IGVH, la mTPT fue inferior en los casos U-LLC con respecto a los M-LLC, y en concreto, de 27 meses en los casos con IGVH3-21 (mTPT 91 vs. 153 vs. 27 meses, para U-LLC, M-LLC e IGVH3-21, respectivamente, HR 0.26; IC 95% [0.07, 1.05]; $P=0.017$). Además, aquellos con subset asociado presentaron una mTPT menor en comparación a los no estereotipados (27 vs NA, HR 5.31; IC 95% [1.67, 17.19]; $P=0.005$) (Figura 4.6 b) y c)). No se encontraron diferencias significativas entre pacientes con doble reordenamiento (TPT: $P=0.331$) y reordenamientos productivos e improductivos IGVH (TPT: $P=0.360$).

Según la categorización jerárquica de FISH, los casos con del(11q22) tenían mTPT inferior al resto, con 62.3 meses (HR 4.30; IC 95% [0.79, 23.41]; $P=0.091$), mientras que las anomalías de alto riesgo, como del(17p13), cariotipo complejo y $TP53_{mut}$, no se asociaron con un TPT inferior en este estudio; no se observaron diferencias significativas entre los pacientes con ausencia y presencia de del17p o/y $TP53_{mut}$ (mTPT, 155 vs 150 meses, $P=0.390$).

En el análisis multivariante, se incluyeron los factores con $P<0.20$ del análisis univariante, identificando la edad (>65 años), el estado mutacional y la estereotipia del reordenamiento IGVH, como marcadores pronósticos adversos con mTPT inferior (Tabla 4.6).

Variables	Univariante			Multivariante		
	HR	IC 95% HR	<i>p</i> -valor	HR	IC 95% HR	<i>p</i> -valor
Edad >65 años	9.65	2.06-45.15	$P=0.004$	11.18	1.87-66.90	$P=0.008$
Binet_B+C	2.54	1.05-6.13	$P=0.037$			
$\beta 2$ elevado	3.52	0.93-13.29	$P=0.063$			
IGVH	0.27	0.07-1.05	$P=0.017$	0.40	0.13-1.15	$P=0.069$
Subset Sí	5.31	1.65-17.19	$P=0.005$	16.80	3.64-77.89	$P<0.001$
del(11q22)	4.30	0.79-23.41	$P=0.091$			
LLC-IPI	4.43	1.42-13.86	$P=0.010$			

Tabla 4.6 Análisis univariante y multivariante. Tiempo hasta el primer tratamiento. (HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza).

En lo que se refiere a la opción terapéutica, 57 casos (59%) recibieron inmunoterapia como primer esquema terapéutico, mientras que Ibrutinib, fue la elección terapéutica para los 39 restantes (41%).

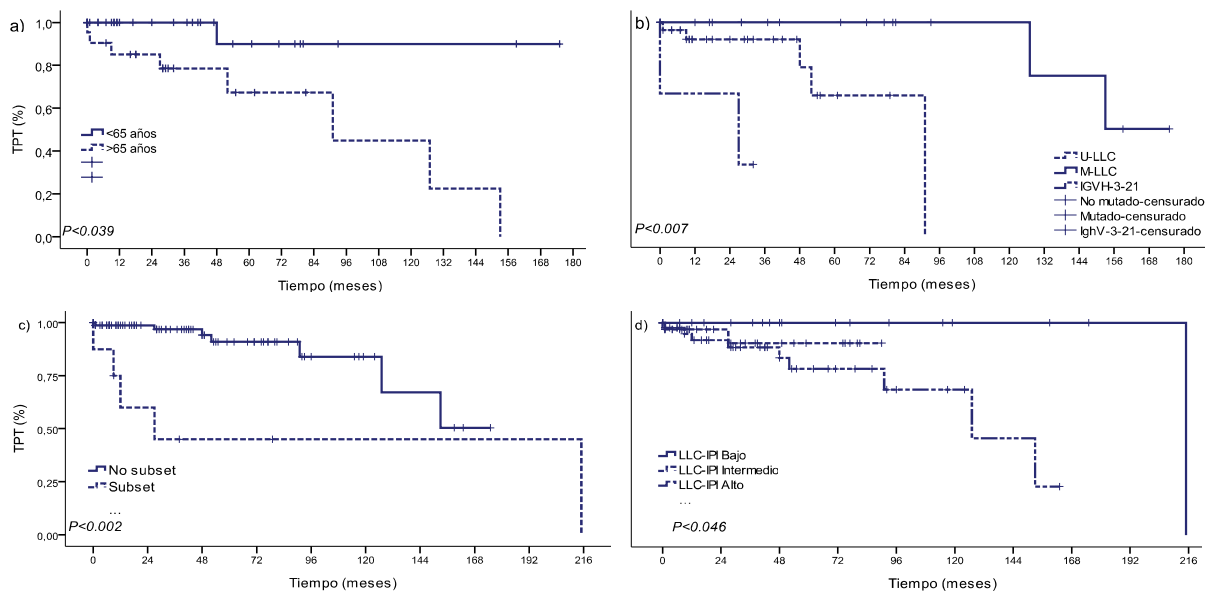


Figura 4.6 Curvas de Kaplan-Meier de características clínicas y moleculares con un tiempo hasta el primer tratamiento (TPT) a) según la edad; b) estado mutacional IGVH; c) presencia de un reordenamiento estereotipado; d) según el grupo de riesgo LLC-IPI.

4.3 Evolución clonal tras primera línea: terapia convencional vs terapia dirigida.

La evolución clonal se modeló en base a las variantes genéticas evaluadas en colecciones de muestras longitudinales, que presentaron frecuencias alélicas variables entre los puntos temporales del análisis molecular. Para ello, se estudiaron un total de 302 muestras secuenciales, con una media de 3 muestras por paciente (1-12), de las cuales aquellas con alteraciones genéticas quedaron recogidas en Anexo 2: Tabla 7. En cincuenta y dos (91%) de los 57 casos que recibieron inmunoterapia como primer esquema terapéutico, se pudo hacer el estudio longitudinal, con un total de 205 muestras secuenciales disponibles; se recogieron un total de 97 muestras de seguimiento en la serie de pacientes tratados con Ibrutinib. Las características moleculares de las dos cohortes se encuentran resumidas en la Tabla 4.7, y más extensamente las características clínico biológicas en el Anexo 2: Tabla 8.

Estudio molecular	Categoría	Inmunoquimioterapia (n=57)	Ibrutinib (n=39)
Estado mutacional IGVH, n (%)	No mutado	35 (61)	26 (67)
	Mutado	18 (32)	11 (29)
	IGVH3-21*	4 (7)	2 (5)
IGVH esteriopado, n (%)		7 (12)	1 (3)
MYD88 _{mut} , n (%)		0 (0)	2 (5)
NOTCH1 _{mut} , n (%)		3 (5)	10 (24)
SF3B1 _{mut} , n (%)		8 (14)	7 (18)
BIRC3 _{mut} , n (%)		3 (5)	0 (0)
TP53 _{mut} , n (%)		2 (3)	12 (31)
XPO1 _{mut} , n (%)		6 (10)	4 (10)
POT1 _{mut} , n (%)		1 (2)	1 (3)
EGR2 _{mut} , n (%)		4 (7)	2 (5)
NFKBIE _{mut} , n (%)		0 (0)	2 (5)
FBXW7 _{mut} , n (%)		4 (7)	1 (3)
ATM _{mut} , n (%)		8 (14)	
MutTP53 y/o del(17p13), n (%)		2 (3)	16 (41)
Nº mutaciones, Mediana (RIQ)		1 (0-1)	1 (0-2)
Índice Pronóstico (LLC-IPI), n (%)	Bajo	10 (17)	7 (18)
	Intermedio	23 (40)	9 (23)
	Alto	23 (40)	11 (28)
	Muy Alto	1 (2)	12 (31)

Tabla 4.7 Características moleculares de la serie a estudio según la primera línea de tratamiento recibida. (RIQ: rango intercuartil; ND: no determinado).

4.3.1 Estudio de mutaciones de resistencia asociadas a los genes BTK y PLCy2.

4.3.1.1 Diseño, puesta a punto y validación del panel IBR-R.

4.3.1.1.1 Diseño de cebadores.

Se diseñaron un total de 168 cebadores para acotar las regiones de interés (Anexo 2: Tabla 9), y se separaron en dos multiplexes atendiendo a las parejas solapantes o contiguas y/o a las posibles interacciones entre ellos, resultando 41 parejas para la multiplex A y 43 parejas para la multiplex B (Anexo 2: Tabla 10). Las dos multiplexes en conjunto representaron 84 amplicones con una longitud promedio de 245pb.

4.3.1.1.2 Obtención de los fragmentos y optimización de la librería.

Para la optimización del método de preparación de librerías, se amplificaron 7 muestras de pacientes con LLC, obteniéndose tamaños homogéneos y del tamaño esperado (224-298pb) en todos los casos (Figura 4.7). De acuerdo con la metodología (3.3.2), se reajustó la concentración de cada pareja de cebadores hasta conseguir uniformidad en todos los amplicones (Anexo 1: Figuras 3).

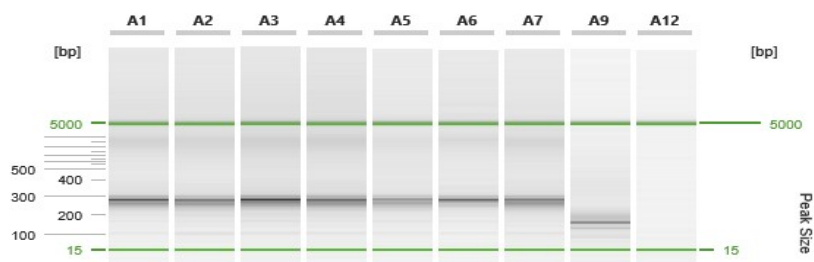


Figura 4.7 Electroforesis capilar tras la optimización del método de preparación de librerías IBR-R. Pocillos A1-A7: muestras control de pacientes con LLC; A9 control barcode; A12: control negativo por condición (Qiagcel (Qiagen N.V. Hilden, Alemania).

4.3.1.1.3 Exactitud del método de análisis

Con una cobertura media superior a 1000x en todas las muestras y en el análisis por cuadruplicado (rango, 1.350 - 10.551x), el porcentaje de las variantes detectadas, fue similar al VAF (%) esperado, con una desviación estándar no superior al 0.23% en ningún caso. En base al valor de incertidumbre y error absoluto, se calculó el error relativo para cada una de las muestras a estudio: para las variantes con VAF (%) esperado superior al 10%, el porcentaje de error relativo fue inferior al 1%; en cambio las variantes con menor frecuencia mutacional, acumularon >1% de error relativo. No se detectaron mutaciones no esperadas en las ocho muestras, así como en la muestra control_WT (0% en todos los casos) (Tabla 4.8).

Muestra control	ADNc	Aminoácido	VAF (%) esperado	VAF (%) detectado				Promedio	DS	Error relativo
Control_BTK_pl1	BTK:c.1442A>C	p.Cys481Ser	100.00	99.81	99.85	99.79	99.91	99.84	0.05	0.04
Control_BTK_pl2	BTK:c.1441T>A	p.Cys481Ser	100.00	99.88	99.82	99.79	99.93	99.86	0.06	0.05
Control_BTK_pl3	BTK:c.1442A>C	p.Cys481Ser	6.00	5.86	5.71	5.93	5.83	5.83	0.09	1.07
	BTK:c.1441T>A	p.Cys481Ser	15.00	14.52	14.88	14.59	14.67	14.67	0.16	0.75
Control_BTK_pl4	BTK:c.1442A>C	p.Cys481Ser	30.00	29.87	30.15	30.35	29.54	29.98	0.35	0.91
Control_PLCG2_pl1	PLCG2:c.1990C>T	p.Pro664Ser	100.00	99.18	99.35	99.19	99.81	99.38	0.30	0.22
Control_PLCG2_pl2	PLCG2:c.2977G>C	p.Asp993His	100.00	99.77	99.81	99.59	99.79	99.74	0.10	0.08
Control_PLCG2_pl3	PLCG2:c.1990C>T	p.Pro664Ser	30.00	30.17	29.71	29.66	29.83	29.84	0.23	0.55
	PLCG2:c.2977G>C	p.Asp993His	10.00	10.21	10.11	9.87	10.09	10.07	0.14	0.99
Control_PLCG2_pl4	PLCG2:c.1990C>T	p.Pro664Ser	10.00	9.81	9.79	10.18	10.01	9.95	0.18	1.48
	BTK:c.1442A>C	p.Cys481Ser	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Control_WT	BTK:c.1441T>A	p.Cys481Ser	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	PLCG2:c.2977G>C	p.Asp993His	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	PLCG2:c.1990C>T	p.Pro664Ser	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla 4.8 Exactitud del método de análisis. Cálculo del error relativo para cada una de las muestras estudio según el porcentaje de mutación esperado y el detectado (DS: desviación estándar; VAF: frecuencia alélica de la variante; valores de expresados en porcentaje).

4.3.1.1.4 Precisión del método de análisis.

En el estudio de la repetibilidad, las muestras fueron evaluadas por triplicado en un misma carrera de secuenciación, con una cobertura media obtenida de 3.413x (rango, 1.258 – 5.601x), y con un VAF (%) promedio homogéneo cuya desviación estándar no superó el 1%. El coeficiente de variación no superó el 1%, excepto para las variantes subclonales con un VAF \leq 10%, en el Control_BTK_pl3 y Control_PLCG2_pl4, en el que se observó un mayor grado de variabilidad (Tabla 4.9).

Muestra control	VAF (%) observado	Promedio	DS	CV	Muestra control	VAF (%) observado	Promedio	DS	CV
Control_BTK_pl1	99.81	99.52	0.31	0.31	Control_PLCG2_pl1	99.18	99.35	0.17	0.17
	99.56					99.37			
	99.19					99.51			
Control_BTK_pl2	99.79	99.69	0.11	0.11	Control_PLCG2_pl2	99.77	99.71	0.13	0.13
	99.58					99.56			
	99.71					99.81			
Control_BTK_pl3	5.83	5.58	0.23	4.15	Control_PLCG2_pl3	30.17	30	0.18	0.60
	5.37					30.03			
	5.55				29.81				
	14.52	14.58	0.10	0.65	Control_PLCG2_pl4	10.21	10.06	0.14	1.40
	14.53					10.05			
14.69	9.93								
29.87	9.81								
30.12	10.11								
29.88	9.93								
Control_BTK_pl4		51.23	0.14	0.47			9.95	0.15	1.52

Tabla 4.9 Precisión del método de análisis: Repetibilidad. Cálculo de la DS y CV para cada una de las muestras triplicadas a estudio según el porcentaje de mutación detectado (DS: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; VAF: frecuencia alélica de la variante; valores de expresados en porcentaje).

En el estudio de reproducibilidad (*inter-run*), las muestras fueron evaluadas en tres carreras de secuenciación diferentes, alcanzando una cobertura media por run de 3.691x, 3.289x y 4.438x, respectivamente, y con una uniformidad media del 97.83% (rango, 97.16 – 98.48%). El VAF (%) promedio fue homogéneo entre las carreras, con una desviación estándar no superior al 1%, y con valores de CV (%) entre 0.08-7.11% para las mutaciones en *BTK*, e inferiores en las observadas para *PLCγ2* (rango 0.48-1,64). El valor CV (%) máximo detectado (7.11%), se asoció a la variante subclonal Control_BTK_pl3 (Tabla 4.10).

Muestra control	ADNc	Run	VAF	Promedio	DS	CV	Muestra control	ADNc	VAF	Promedio	DS	CV				
Control_BTK_pl1	BTK:c.1442A>C	1	99.81	99.79	0.15	0.15	Control_PLCG2_pl1	PLCG2:c.1990C>T	99.18	99.3	0.48	0.48				
		2	99.92						99.83							
		3	99.63						98.89							
Control_BTK_pl2	BTK:c.1441T>A	1	99.79	99.75	0.08	0.08	Control_PLCG2_pl2	PLCG2:c.2977G>C	99.77	99.43	0.68	0.69				
		2	99.66						99.87							
		3	99.80						98.64							
Control_BTK_pl3	BTK:c.1442A>C	1	5.83	5.48	0.39	7.11	Control_PLCG2_pl3	PLCG2:c.1990C>T	30.17	30	0.49	1.64				
		2	5.06						30.38							
		3	5.55				29.44									
	BTK:c.1441T>A	1	14.52	14.62	0.32	2.16	Control_PLCG2_pl4	PLCG2:c.2977G>C	10.21	10.12	0.10	1.01				
		2	14.36						10.15							
3	14.97	10.01														
Control_BTK_pl4	BTK:c.1442A>C	1	29.87	29.61	0.42	1.41			PLCG2:c.1990C>T				9.81	9.76	0.10	1.01
		2	29.13										9.83			
		3	29.83				9.65									

Tabla 4.10 Precisión del método de análisis: Reproducibilidad. Cálculo de la DS y CV para cada una de las muestras a estudio evaluadas en tres carreras de secuenciación diferentes (DS: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; VAF: frecuencia alélica de la variante; valores de expresados en porcentaje).

4.3.1.1.5 Sensibilidad y especificidad del método de análisis.

El promedio del porcentaje obtenido de las variantes BTK:c.1442A>C y PLCG2:c.1990C>T detectadas a 10%, 5%, 2% y 1% de VAF (%), se aproximó al esperado, de manera independiente a la

carga mutacional inicial de partida y al número de lecturas que soportaban la variante. A mayor promedio de VAF (%) observado, el valor de la DS aumentó, alcanzando la mínima diferencia a 1000x y la máxima a 100x lecturas (0.34 vs 1.18, respectivamente), sin superarse en ningún caso el 2% de DS (Anexo 2: Tabla 11).

La variante BTK:c.1442A>C detectada a VAF=1%, mostró un CV superior al 20% en todos los casos, y próximo al 20% a 1000 lecturas (13.75%). A medida que aumentó el VAF (%) y la profundidad de secuenciación, el CV fue alcanzando el valor del *threshold*, incluso superándolo a 1000 lecturas. Para la variante PLCG2:c.1990C>T, la tendencia fue similar, llegándose a alcanzar $CV \leq 20\%$ a 500 lecturas independientemente del VAF (%) (Figura 4.8). Por tanto, al 1% de mutación y con más de 1000 lecturas, el CV alcanzando fue inferior al 20%, y se determinaron estos valores de referencia, como rango de lecturas y porcentaje de mutación mínimos para el panel IBR-R.

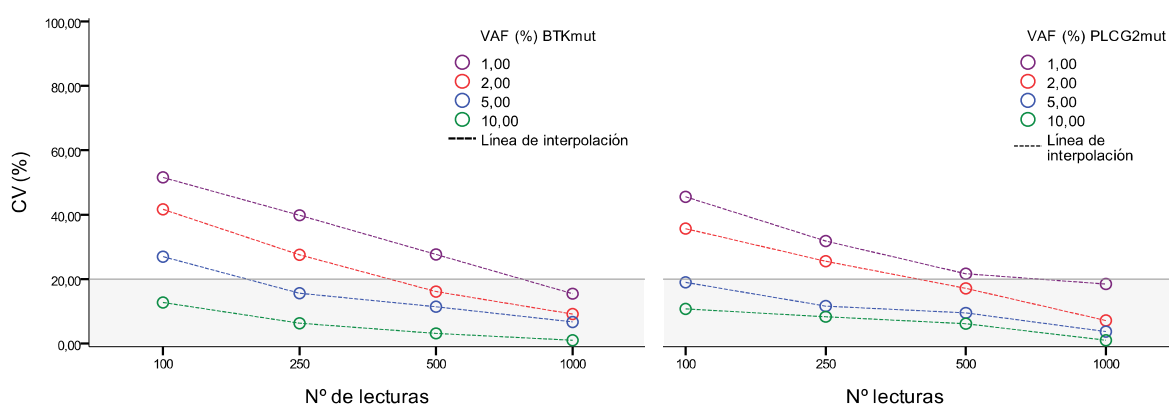


Figura 4.8 Representación de los valores CV (%) en función del número de lecturas de secuenciación: para la variante BTK:c.1442A>C (izquierda) y variante PLCG2:c.1990C>T (derecha) (para todas las rectas $r^2 > 0.9$ y $p < 0.05$).

En base a estos resultados, se determinó que a 1000 lecturas, la sensibilidad y especificidad analítica a $VAF \geq 1\%$ fue del 100%, estableciendo el 1% de frecuencia mutacional como límite de detección para el panel IBR-R.

4.3.2 Análisis de calidad de secuenciación y cobertura en el seguimiento.

En el estudio secuencial, se evaluó el estado mutacional de los genes incluidos en los paneles TP53, OG-CLL, OG-CLL2 e IBR-R. El porcentaje mapeado *on-target* fue $>85\%$, y se alcanzó una cobertura media superior con respecto al estudio pretratamiento (19.671 vs 21.294x, $P=0,042$), 21.294x por gen (13.575 - 25.301x), de los cuales 50% con una cobertura igual o superior a este umbral (Tabla 4.11). A pesar de ello, el exón 1 del gen *EGR2* y ciertas regiones del panel IBR-R (exón 4 y 15 *PLCγ2*, y exón 5 *BTK*), no se superaron 500x de cobertura (Anexo 2: Tabla 12).

Gen	Exón	Número amplicones	Cobertura mínima (Media)	Cobertura media (Media)
TP53	11	19	12.123,05	13.575,27
BIRC3	6-9	9	14.991,68	17.260,55
NOTCH1	34	15	16.433,09	19.659,14
MYD88	5	2	17.432,86	20.631,30
SF3B1	14-16	7	15.731,68	19.318,91
NFKBIE	1	8	17.434,27	21.957,59
XPO1	14-16	5	18.881,95	23.422,73
EGR2	1-2	14	20.099,55	24.877,70
FBXW7	8-12	12	19.974,36	25.081,36
POT1	6-9	10	19.563,41	24.876,32
BTK	19	30	24.769,42	25.301,03
PLCY2	33	51	16.153,83	17.323,77

Tabla 4.11 Cobertura mínima y media total de las muestras de seguimiento para cada gen a estudio.

Más del 94% de las muestras de seguimiento, presentaron una cobertura media $\geq 1000x$ para el panel TP53 (94%) y paneles OG-CLL (98%) y OG-CLL2 (95%), y con una cobertura relativa inferior en el panel IBR-R (88%), obteniendo mayor profundidad con respecto al análisis pretratamiento ($P=0.040$) (Tabla 4.12) (Anexo 1: Figuras 4).

Panel	Media Casos cobertura media $\geq 1000x$ (%)	Media Casos cobertura media $\geq 500x$ (%)	Media Casos cobertura media $\geq 250x$ (%)	Media Casos cobertura media $< 250x$ (%)
TP53	94.09	2.53	2.08	1.30
OG-CLL	98.46	0.95	0.35	0.24
OG-CLL2	94.83	1.96	0.83	2.38
IBR-R	88.94	2.90	2.02	6.15

Tabla 4.12 Porcentaje de muestras de seguimiento con una cobertura media por panel de $\geq 1000x$, $\geq 500x$, $\geq 250x$ y $< 100x$, respectivamente.

4.3.3 Inmunoquimioterapia.

4.3.3.1 Asociación con el seguimiento y la respuesta al tratamiento.

Cincuenta y siete casos (59%) recibieron IQT entre 2003 y 2019, con una media de seguimiento tras la primera línea de tratamiento de 71 meses (RIQ, 50 a 106 meses) [esquema FCR (19, 33%); R-Benda (19, 33%), Obinutuzumab-clorambucil (5, 9%), R-CHOP (4, 7%), otros (18%)]. En 52 de los casos iniciales (91%), la evaluación del seguimiento fue clínico y molecular: LLC-7 fue exitus a los cuatro meses del inicio de la terapia, por causas no relacionadas con la patología; LLC-55, LLC-58, LLC-68 y LLC-76 no se disponía de muestra secuencial para su evaluación molecular, pero sí datos clínicos de seguimiento (Anexo 1: Figuras 5). Treinta y siete casos (65%) presentaron progresión de la enfermedad a largo plazo, y 11 (19%) fueron exitus. La mediana de tiempo transcurrido entre la RC y la progresión clínica fue de 38 meses (RIQ, 28 a 54 meses).

Durante el seguimiento, se detectaron 11 mutaciones (rango 1-3) con frecuencias alélicas clonales (9/11, 81%), en 8 de los 19 pacientes que permanecieron en RC (16, 84%) y RP (3, 16%). La mayoría de ellas (10/11, 91%), negativizaron a los 13 meses de seguimiento (mediana 13, 8-26 meses), al igual que la dinámica observada en el componente linfocitario secuencial, con una mediana de

linfocitos absolutos en el momento previo al tratamiento de $60.11 \times 10^9/L$ (RIQ, 28.42 – $89.62 \times 10^9/L$ linfocitos), y con una disminución del 97% (RIQ, 96.44%-98.59%) al evaluar la primera muestra de seguimiento (mediana 1.12, RIQ 0.62- $1.56 \times 10^9/L$) ($P < 0.001$).

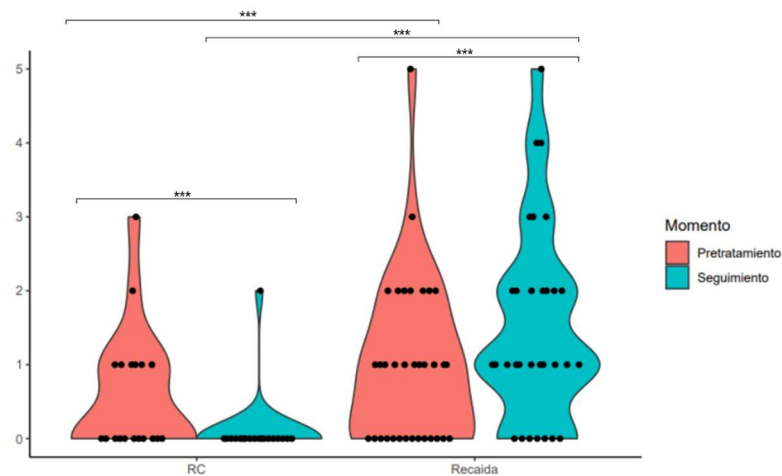


Figura 4.9 Comparación del número de mutaciones detectadas (incluidas deleciones e inserciones) en la muestra previa y postratamiento, del grupo de pacientes en RC y en recaída a la IQT. Rojo: pretratamiento; Azul: muestra de seguimiento o recaída (***) ($P < 0,05$).

A pesar de la respuesta clínica observada, dos pacientes mostraron comportamientos moleculares atípicos al resto de la cohorte. En el caso LLC-36 con una evaluación RC a los 8 meses de tratamiento, una de las variantes detectadas pretratamiento (*FBXW7*_{mut} c.1634A>G, 9.39% VAF) siguió siendo persistente a nivel subclonal, y se detectó una segunda variante subclonal en el mismo gen (*FBXW7*_{mut} c.1383_1389delTTCCAAT, 8.66% VAF), pese a que el recuento linfocitario disminuyó en un 82% (8.35 vs $1.47 \times 10^9/L$) a los 13 meses de seguimiento. El paciente LLC-20, en RP a los 8 meses de tratamiento, no presentó alteraciones genéticas previas ni en el seguimiento molecular, aunque sufrió un aumento del 5% de los linfocitos absolutos con respecto a los valores pretratamiento (91.98 vs $96.83 \times 10^9/L$) a los 21 meses de seguimiento.

Los pacientes no respondedores, mostraron una mayor heterogeneidad molecular inicial (33 variantes, mediana 2 [0-5] mutaciones somáticas), con cambios clonales notables en el perfil genético de la recaída en la mayoría de los casos, reflejado en un 33% más de mutaciones detectadas ($P = 0.045$) (Figura 4.9).

Se apreciaron cambios significativos en lo que se refiere al VAF(%) en muestras pareadas, identificándose tres patrones generales. En primer lugar, las aberraciones citogenéticas, a excepción de la del(17p13), tendieron a permanecer clonales estables a lo largo del tiempo (trisomía 12, $n=2$ vs 3, del(13q14) $n=4$ vs 7, y del(11q22) $n=5$ vs 6, NS). En segundo lugar, la aparición de nuevas mutaciones genéticas *driver* en el gen *TP53* y *SF3B1*, y la del(17p13), se asoció con la resistencia a la IQT ($P < 0.031$, $P < 0.003$, y $P < 0.05$, respectivamente) (Figura 4.10). La mayoría de las *TP53*_{mut} fueron adquiridas (11/13, 85%), todas ellas descritas en 7 pacientes, lo que mostró una evolución convergente en el 43% de los casos (3/7, rango 1-4 variantes), aunque en su mayoría, con una frecuencia alélica subclonal (8/13, 62%).

De manera similar, se adquirieron 7 de las 13 *SF3B1*_{mut}, en 11 pacientes, en el que la evolución convergente fue menos representada (1/11, 9%) y que, por contra, se detectaron en frecuencias clonales (8/13, 62%). La del(17p13) fue adquirida en 3 de 4 pacientes, y en asociación con *TP53*_{mut} (3/4, 75%). En tercer lugar, las mutaciones en el resto de genes, fueron tan probables de disminuir en VAF(%) como de aumentar.

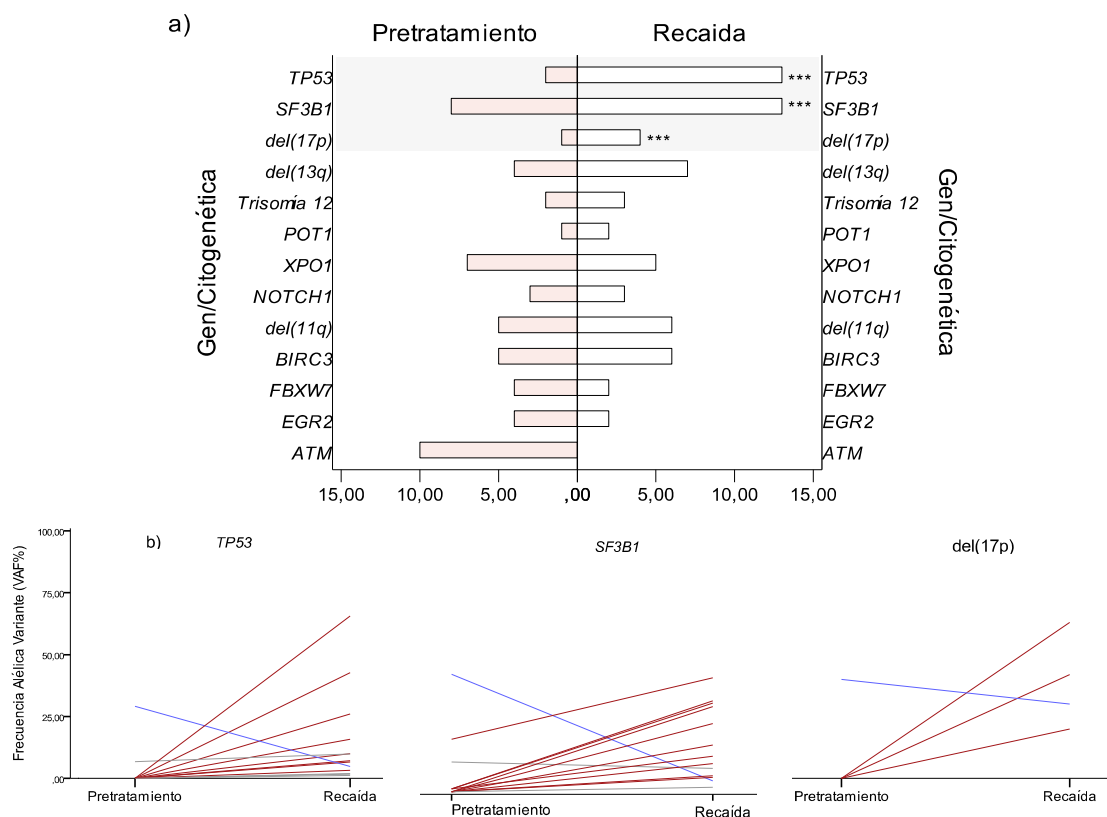


Figura 4.10 Variación del perfil genético en la recaída. a) Número de mutaciones detectadas en las muestras pareadas en la cohorte de pacientes tratados con IQT (izquierda: pretratamiento; derecha: muestra de seguimiento o recaída, $*P < 0.05$). b) Las mutaciones adquiridas en los genes *TP53* y *SF3B1*, y la del(17p13) revelaron el patrón de evolución clonal más relacionado con el mecanismo de resistencia molecular a la IQT (proporción de casos en los que el VAF(%) aumentó (rojo), disminuyó (azul) o se mantuvo estable (gris) a lo largo del tiempo). El cambio VAF(%) fue significativo a lo largo del tiempo (rojo o azul) al no superponerse los IC 95% del VAF(%) en la muestra pretratamiento y recaída.

Con objeto de aportar mayor precisión al impacto del tratamiento en la dinámica mutacional, se normalizó el valor de VAF (%) a la proporción de células CD19+/CD5+ evaluadas por citometría de flujo en cada muestra, obteniendo el valor de fracción de células cancerosas (CCF). Una mutación se consideró estable cuando el log2 fold-change (Log2FC) de los valores de CCF antes y después del tratamiento se encontraba entre -0.5 y 0.5, disminuyendo o aumentando si Log2FC era < -0.5 o > 0.5 , respectivamente. Según el CCF, 2 de 55 (4%) mutaciones disminuyeron, 14 (25%) variantes persistieron estables, 9 (16%) fueron indetectables, 7 (13%) mutaciones aumentaron CCF, mientras que 23 (42%) fueron de nueva aparición. El 83% de las variantes indetectables se asociaron al grupo RC (5/6), mientras que el 92% de las adquiridas y el 100% con CCF aumentado, se describieron en los pacientes en recaída (12/13 y 6/6, respectivamente) ($P < 0.001$) (Figura 4.11). A excepción de la dinámica observada en los

casos con RC, el paciente LLC-36 presentó una dinámica adquirida, con un CCF estable en combinación con la delección *FBXW7*_{mut} de nueva aparición.

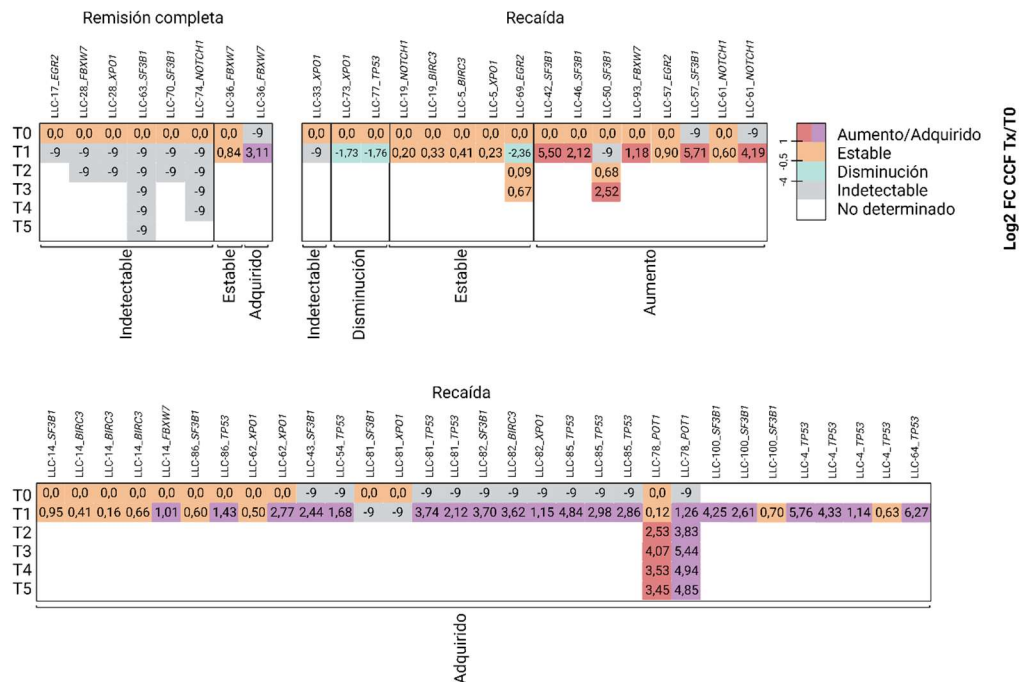


Figura 4.11 Dinámica clonal de las mutaciones detectadas bajo tratamiento con IQT en pacientes sin tratamiento previo. Heatmap con el CCF log₂-fold-change (Log₂FC) para cada mutación. El código de color indica la tendencia de cada mutación a lo largo del tiempo: indetectable (<-4), disminución (<-0,5), estable (-0,5 y 1), adquirido y/o aumento (>1).

En cuanto a la importancia pronóstica del perfil genético mutacional y en base a la dinámica clonal de los pacientes tratados con IQT, se analizó, en términos de respuesta, la supervivencia libre de progresión (SLP). Los pacientes mayores, >65 años, y de grupo de riesgo intermedio y alto según el índice LLC-IPI, mostraron una SLP más baja y un mayor riesgo de recaída en comparación con los pacientes más jóvenes y de bajo riesgo ((SLP, mediana, 33 vs. 54 meses, $P=0.045$; grupo LLC-IPI bajo, intermedio y alto, mediana, NA vs 50 vs 33, $P=0.001$). Además, el comportamiento fue similar en los casos U-LLC y con ≥ 2 mutaciones pretratamiento asociadas (IGVH U-LLC y M-LLC, mediana, 39 vs 61, $P=0.025$; 0-1 ó ≥ 2 mutaciones genéticas, mediana, 50 vs 35 meses, $P=0.049$). La aparición de aberraciones genéticas en *TP53* [*TP53*_{mut} y/o del(17p13)] y en *SF3B1*_{mut} en el seguimiento molecular, aumentó el riesgo de progresión después del tratamiento con una SLP inferior (*TP53*_{alt} vs *TP53*_{wt}, mediana, 29 vs 40, $P=0.051$; *SF3B1*_{mut} vs *SF3B1*_{wt}, mediana, 33 vs 61, $P=0.002$). La dinámica clonal con aumento o adquisición de mutaciones/CCF, mostró una influencia estadísticamente significativa en la progresión temprana, frente al patrón estable observado en los pacientes en recaída, y con los de evolución clonal indetectable en la cohorte RC, respectivamente (CCF aumento/adquirido vs estable vs indetectable, mediana, 33 vs 61 vs NA, $P=0.035$). El 75% (18/24) de los pacientes en recaída clínica, presentó un perfil CCF adquirido/aumentado ($P<0.016$), de los cuales el 81% (13/16) pertenecían al subgrupo LLC-IPI alto/muy alto riesgo ($P<0.035$) (Figura 4.12).

En los análisis multivariados de las variables que resultaron significativas en el análisis univariado (regresión de Cox PH) para SLP, los pacientes mayores (HR: 0.33, $P=0.028$), con LLC-IPI de alto riesgo (HR: 2.84, $P=0.016$), así como mutaciones adquiridas o con CCF aumentado (HR: 1.55, $P=0.039$), aumentaron el riesgo de progresión después del tratamiento (Tabla 4.13).

Variables	Univariante			Multivariante		
	HR	IC 95% HR	<i>p</i> -valor	HR	IC 95% HR	<i>p</i> -valor
Edad < 65 años >	1.96	0.99-3.87	$P=0.051$	0.33	0.12-0.89	$P=0.028$
IGVH U-LLC vs M-LLC	0.40	0.17-0.92	$P=0.032$			
LLC-IPI Alto/Muy alto	2.65	1.55-4.54	$P<0.001$	2.84	1.21-6.68	$P=0.016$
Cariotipo complejo	27.29	2.4-309.6	$P=0.008$			
>2 mutaciones	1.45	0.98-2.14	$P=0.050$			
<i>SF3B1</i> _{mut} vs <i>SF3B1</i> _{wt}	3.14	1.45-6.79	$P=0.004$			
<i>TP53</i> _{alt} vs <i>TP53</i> _{wt}	0.91	0.61-3.34	$P=0.056$			
CCF Adquirido/Aumentado	1.51	1.05-2.18	$P=0.024$	1.55	1.02-2.36	$P=0.039$

Tabla 4.13 Análisis univariante y multivariante. Supervivencia libre de progresión. (HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza).

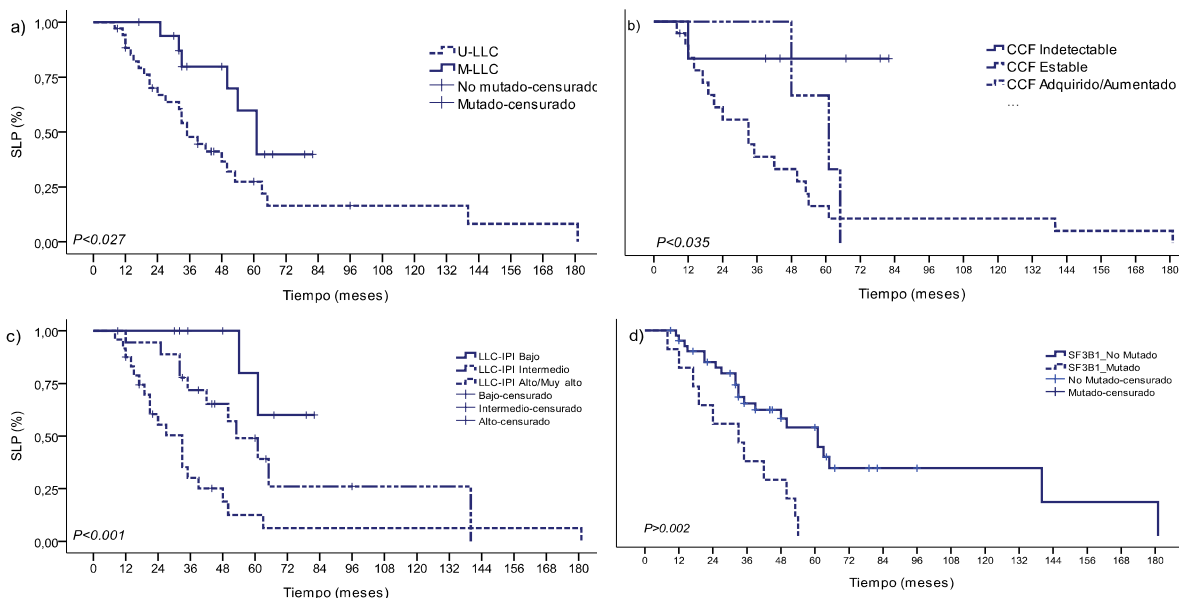


Figura 4.12 Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión para pacientes tratados con IQT como primera línea de tratamiento. a) SLP según el estado mutacional IGVH; b) CCF indetectable, estable o con perfil adquirido/aumentado c) LLC-IPI de riesgo bajo, intermedio y alto/muy alto d) según estado mutacional del gen *SF3B1* ($P<0.05$).

4.3.3.2 Evolución clonal y enfermedad mínima residual.

La EMR fue evaluada por CF en 80 muestras secuenciales de cincuenta y dos pacientes (91%) tratados con IQT, con al menos una muestra posterior al tratamiento por caso (1-5). De los pacientes libres de progresión (19/52, 36%), 15 (79%) lograron EMR indetectable ($EMR_i < 10^{-4}$) a los 14 meses (IC 95%, 12.08-42.58 meses), de los cuales 3 (16%) inicialmente presentaron respuesta parcial al final del tratamiento. En cambio, 4 casos (21%) permanecieron con EMR positiva (EMR_+) a los 12.5 meses, habiendo entrado el 75% de ellos en RC (3/4). A pesar del reducido número de casos con estas características, la SG de estos pacientes fue más corta que los que mostraron EMR_i , incluso recaída clínica (HR, 9.84; IC 95%, 1.28-7.49, $P<0.027$) (Figura 4.13 e)).

En base a estos resultados, y según lo esperado, se analizó la SLP y SG en función de la EMR detectada, obteniendo una marcada disminución de la SLP (HR, 0.12; IC 95%, 0.11-0.63, $P<0.029$), en los casos con EMR+, y una potencial SG inferior para este subgrupo de pacientes ($P<0.076$) (Figura 4.13 a) y b)). No se observaron diferencias significativas en la SLP entre los casos U-LLC y M-LLC con EMRi, aunque sí fue más prolongada en comparación con el subgrupo de pacientes con EMR+, y en concreto entre M-LLC y U-LLC ((HR, 4.11; IC 95%, 1.88-8.99, $P<0.001$) (Figura 4.13 c)). Hubo una tendencia hacia una SLP inferior al comparar la EMR en función de la evolución clonal CCF (HR, 2.20; IC 95%, 0.99-4.88, $P<0.051$). En este caso, el 100% de los pacientes con EMRi presentó un comportamiento CCF indetectable en la última muestra de seguimiento ($P<0.001$), mientras que el 65% de los pacientes con EMR+ desarrollaron una evolución clonal CCF adquirida o aumentada, siendo el 10% restante, el que mantuvo un componente clonal CCF estable (Figura 4.13 d)).

En el análisis multivariable, tanto U-LLC (HR 10.32 [1.82-59.07], $P=0.009$) como β 2-microglobulina elevado (HR 2.88 [1.13-7.33], $P=0.026$) se asociaron significativamente con una SLP menor en pacientes con EMR positiva (Tabla 4.14).

Respecto a la asociación entre las características pretratamiento y la probabilidad de EMRi por NGS, los pacientes con β 2-microglobulina dentro de los límites de la normalidad frente a los de valores elevados (HR 0.56 [0.31-1.00], $P<0.049$), y con M-LLC frente a U-LLC (HR 0.45 [0.20-1.00], $P<0.048$) tenían una mayor probabilidad de lograr EMRi. No hubo otras características previas al tratamiento asociadas, a excepción de los pacientes más jóvenes (<65 años) (HR 0.65 [0.38-1.07], $P=0.089$) y con una o ninguna mutación genética detectada en la muestra inicial (HR 0.69 [0.49-0.98], $P=0.055$), con una potencial significancia.

Variables	Univariante			Multivariante		
	HR	IC 95% HR	p-valor	HR	IC 95% HR	p-valor
Edad < 65 años >	4.98	(2.00-12.39)	<0.001			
β 2 elevado/normal	2.96	(1.67-5.25)	<0.001	2.88	(1.13-7.33)	0.026
BINETA vs B+C	4.40	(1.77-10.92)	<0.001			
M-LLC vs U-LLC	4.11	(1.88-8.99)	<0.001	10.32	(1.82-59.07)	0.009
CCF Indet vs Adq/Aum	2.20	(0.99-4.88)	0.051			
LLC-IPI Bajo/Intermedio vs Alto/Muy Alto	3.99	(1.82-8.72)	<0.001			
0-1 vs \geq 2 mutaciones	3.31	(1.77-6.20)	<0.001			
Del(11q22)/del(17p13) vs otras	4.19	(1.92-9.16)	<0.001			

Tabla 4.14 Análisis univariante y multivariante Supervivencia libre de progresión EMR.

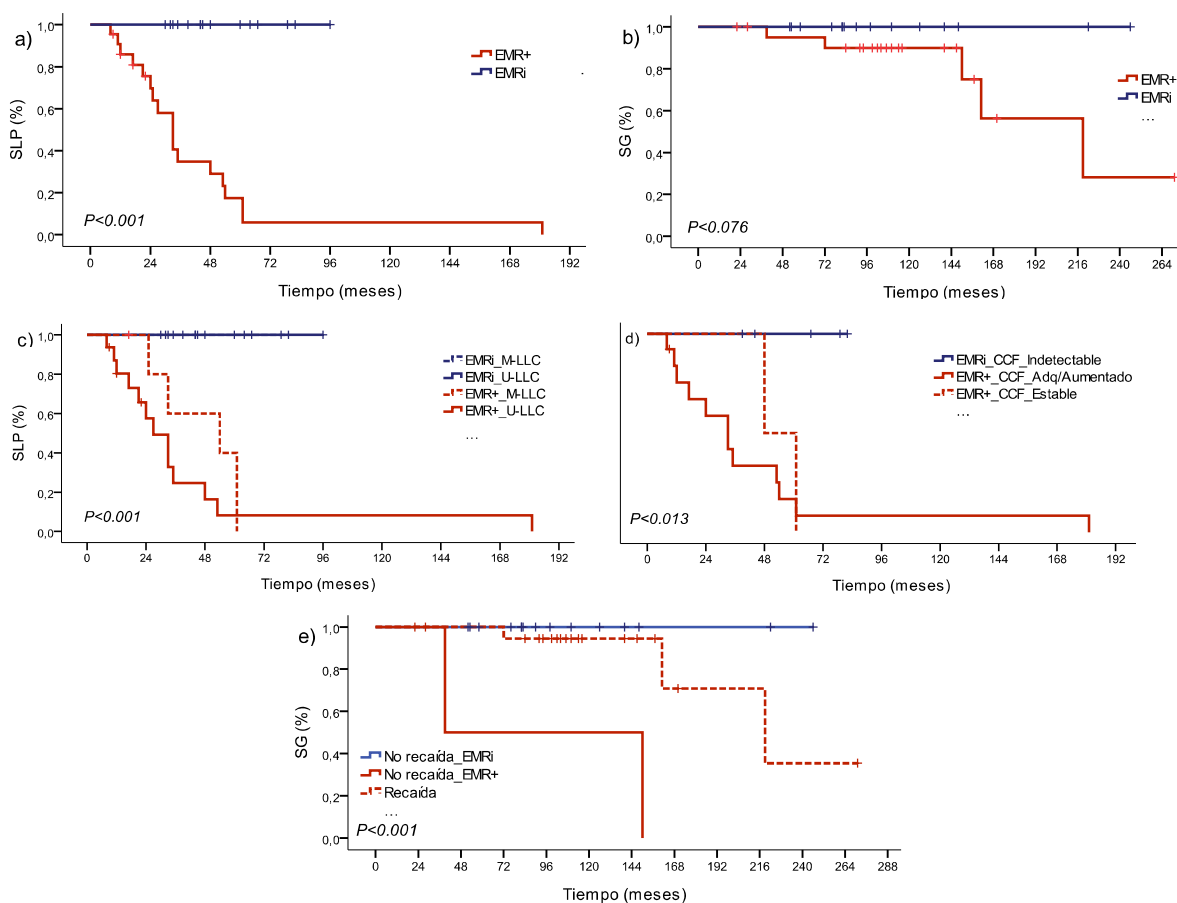


Figura 4.13 Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión y supervivencia global según el estado de EMR postratamiento. a) SLP según la EMR positiva o indetectable; b) SG de la cohorte en función de la EMR positiva o indetectable; c) SLP en función de la EMR y el estado mutacional de IGVH; d) SLP según la EMR y la evolución clonal CCF de las mutaciones detectadas en la última muestra de seguimiento en comparación con la muestra inicial pretratamiento; e) SG de los pacientes respondedores y en recaída clínica, y su distinción en función de la EMR (EMR: enfermedad mínima residual; EMRi: enfermedad mínima residual indetectable; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión; CCF: *cancer cell fraction*).

4.3.4 Terapia dirigida: Ibrutinib.

4.3.4.1 Composición y dinámica clonal según VAF y CCF.

Treinta y nueve pacientes (41%) recibieron Ibrutinib en monoterapia entre 2016 y 2019, con una mediana de seguimiento clínico y molecular de 38 meses (RIQ 28 a 43 meses). Treinta y seis casos (88%), lograron respuesta global y 3 (8%) con enfermedad recidivante a Ibrutinib exhibiendo transformación a Síndrome de Richter. El tratamiento fue interrumpido en el 10% (4/39) de los pacientes por toxicidad (grado 3-4). La mediana de tiempo transcurrido hasta la recaída clínica fue de 34.6 meses (rango, 7 a 59 meses).

Para cada paciente, se comparó la composición clonal de la muestra inicial con la última muestra recogida durante el tratamiento (tiempo medio 26.9, rango 6-59 meses), y se evaluó el seguimiento de las trayectorias clonales a través de las muestras en serie, a partir del VAF (%) de todas las variantes identificadas, y del valor CCF. A los tres meses, se observó un aumento discreto del CCF [media recortada

al 5%, 27.88% (IC 95%: 0.55-59.62%)), seguido de una disminución del 70.91% [media recortada al 5%, (IC 95%: 56.59-80.12%)] durante los siguientes 6 meses (Figura 4.14 a)). La disminución media CCF permaneció estable a partir del primer año, y en los consecutivos [media recortada al 5%, 83.14% (IC 95%: 53.27-96.58%); 86.32% (IC 95%: 71.97-94.65%); 95.43 (IC 95%: 80.86-96.02), a los 24, 36 y 48 meses]. Al evaluar el cambio CCF con respecto al tiempo en valor absoluto ($dCCF/dt$), se observó una desaceleración exponencial durante el primer año (media recortada al 5%, 0.2588% vs 0.0499% vs 0.0159%, 3, 6 y 12 meses), mientras que la disminución en la dinámica posterior fue menos pronunciada (media recortada al 5%, 0.0043% vs 0.0011 vs 0.0003%, a los 24, 36 y 48 meses) (Figura 4.14 b)).

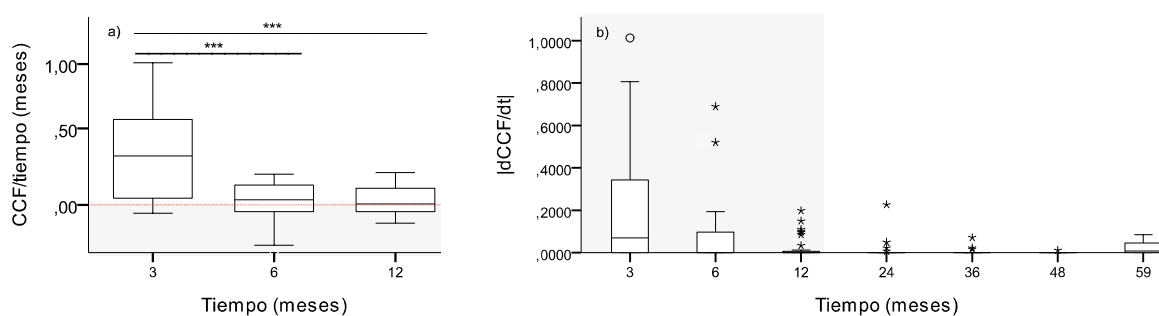


Figura 4.14 Cinética específica del genotipo y progresión de la enfermedad durante el tratamiento con Ibrutinib. A) Representación en diagrama de cajas del ratio entre CCF con respecto al tiempo (meses) a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento ($dCCF/dt$), con una variación significativa del componente clonal (Línea discontinua roja con valor 0) (***) ($P < 0.05$). B) Ratio absoluto de ($dCCF/dt$), durante todos los tiempos de seguimiento (recuadro gris: primer año de tratamiento).

Con un 39% menos de mutaciones detectadas en las muestras de seguimiento (54 vs 33) (Figura 4.15 a)), se identificó evolución convergente en el 27% (3/11) de los genes analizados en un porcentaje inferior de pacientes ($n=3$, 12% vs $n=7$, 28%): tres variantes en *SF3B1* en el caso LLC-37, dos en *TP53* en LLC-49, y dos mutaciones en *FBXW7* de nueva aparición en el paciente LLC-91, de frecuencia alélica subclonal en todos los casos. Tal y como se ilustra en la Figura 4.15, la tasa $dCCF/dt$ de las mutaciones detectadas en los genes *driver* más representados en la serie, *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1* y *XPO1*, mostró una estabilidad clonal, sin una tendencia clara hacia el aumento o la disminución independientemente de su frecuencia subclonal o clonal en la muestra inicial, en los primeros 12 meses.

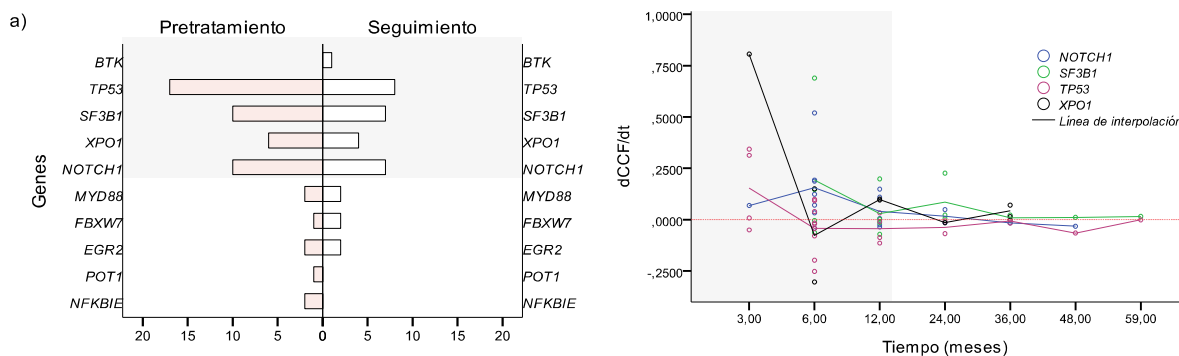


Figura 4.15 Variación del perfil genético en el seguimiento con Ibrutinib. a) Número de mutaciones detectadas en las muestras pareadas en la cohorte de pacientes tratados con Ibrutinib (izquierda: pretratamiento; derecha: muestra de seguimiento o recaída) (ATM_{mut} no determinado). b) Diagrama de dispersión de $dCCF/dt$, según el gen *driver* afectado (línea de interpolación).

Según el CCF de *TP53*_{mut}, con 21.11 meses de seguimiento (RIQ: 11.28-66.21), 59% (10/17) de las mutaciones iniciales, fueron indetectables a los 18.33 meses (RIQ: 9.90-27.29), mientras que 12% (2/17) mostraron una disminución y 35% (5/17) persistieron estables a los 21 meses (RIQ: ND; RIQ 6.00-45.50, resp). En ningún caso se detectaron variantes de nueva aparición o con CCF aumentado. El 70% (7/10) de las variantes indetectables, presentaron un VAF<10% inicial, siendo las de carga clonal VAF<39% a excepción de la variante LLC-51_*TP53*:c.476C>T (VAF 72.53%), la cual fue disminuyendo de forma progresiva, permaneciendo estable a los 6, reducida a los 24 y con CCF indetectable a los 36 meses [log₂ FC CCF: (-0.13) vs (-0.62) vs (-0.90), resp] (Anexo 1: Figuras 6). En cambio, el 100% de las estables fueron clonales con mediana VAF 52.33% (rango, 18.18-96.71%).

Con 29.33 meses (RIQ: 14.45-43.54) de seguimiento, las mutaciones detectadas en el gen *SF3B1* representaron el 18% (10/54) en la serie inicial, cuya dinámica clonal en CCF de *SF3B1*_{mut}, se diferenció de la descrita para *TP53*. La variante inicial *SF3B1*:c.2098A>G (4, 40%), fue la única con CCF indetectable en las muestras de seguimiento (3, 75%), independientemente de su carga mutacional, a los 19.88 meses (RIQ: 9.73-24.00), a excepción del caso LLC-37_*SF3B1*:c.2098A>G, que permaneció estable a los 12 meses. El 40% de las variantes permanecieron con CCF estable (4/10), y 20% con CCF aumentado (2/10). Además, se detectaron dos mutaciones CCF adquiridas subclonales (20%), una de ellas en el paciente LLC-49_*SF3B1*:c.2098A>G a los 6 meses de tratamiento, que quedó resuelta con CCF indetectable a los 12 meses.

A los 6 meses de tratamiento, el 40% (4/10) de las mutaciones detectadas en *NOTCH1* (10/54, 18%), permanecieron con CCF estable, 30% (3/10) CCF aumentado, y el 10% CCF indetectable (1/10). Escenario similar el observado al año, con 37% CCF estable y 25% CCF aumentado, aunque con un discreto aumento de CCF indetectable alcanzado (37%), las cuales representaron ser las variantes únicas de tres casos (LLC-27, LLC-84 y LLC-89), mientras que el resto de mutaciones, se detectaron en asociación con otras variantes genéticas (mediana 1, rango 1-4). Las variantes con CCF adquirido fueron persistentes hasta los 2 años después, lo que reflejó un aclaramiento más lento de las mutaciones en el gen *NOTCH1*. Las 6 (11%) variantes descritas en el gen *XPO1*, se detectaron tanto con carga clonal como subclonal (3/6, 50%, en ambos casos) en 4 pacientes, con un CCF aumentado en el 50% hasta 20.6 meses de seguimiento. No se detectaron mutaciones adquiridas en ninguno de los 14 casos con perfil molecular pretratamiento no mutado.

4.3.4.2 Cinética del recuento linfocitario en pacientes tratados con Ibrutinib.

Con un RLA inicial de $101.39 \times 10^9/L$ (mediana, RIQ 18.20-140.41 $\times 10^9/L$), se observó una marcada citorreducción a los 6 meses de tratamiento, con una mediana de disminución RLA del 66.48% (RIQ (-) 91.18 – 61.99%) ($P < 0.001$). La magnitud de la linfocitosis inducida por el tratamiento fue variable, sin

embargo, el cambio relativo en RLA fue significativamente diferente para los pacientes con M-LLC, con un aumento más pronunciado y resuelto más lentamente que los U-LLC ($P<0.05$) según la prueba exacta de Fisher (Figura 4.16).

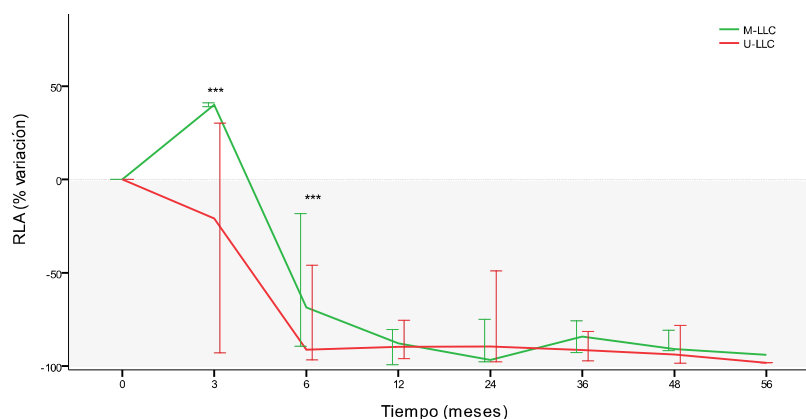


Figura 4.16 Cambio en RLA durante el tratamiento con Ibrutinib según las características del paciente antes del tratamiento. Cambios porcentuales en RLA a partir de la muestra inicial, entre pacientes M-LLC (n=11) en comparación con los U-LLC (n=23). No se muestra la cinética linfocitaria de pacientes LLCP (***) ($P<0.05$). (RLA: recuento linfocitario absoluto).

El RLA durante el mes 3 y 6 de tratamiento, permitió estratificar a los pacientes en tres grupos. Con el RLA más alto (180.15 mediana, RIQ 125.53-213.82, $\times 10^9/L$) observado previo al tratamiento en el grupo 2, la linfocitosis inducida por el tratamiento se resolvió rápidamente a los tres meses, con una reducción de RLA del 92.86% (RIQ (-) 96.31 – 67.77, %). Por el contrario, los pacientes del grupo 1 tendieron a tener un RLA previo al tratamiento más bajo (22.30 mediana, RIQ 18.20-27.50, $\times 10^9/L$) aunque mostraron un mayor aumento relativo de linfocitosis desarrollado a los tres meses que supuso un incremento del RLA del 94.91% (RIQ (+) 9.60 – 194.00, %), resolviéndose más lentamente, y manteniéndose persistente a los 6 meses [21.88% mediana RLA, RIQ (-) 7.47 – (+) 29.35%]. Con una mediana de RLA inicial de $83.95 \times 10^9/L$ (RIQ 37.62 – 142.94, $\times 10^9/L$), el grupo 3 mostró una reducción intermedia de RLA 19.17% con respecto al resto de grupos [RIQ (-) 39.48 – 18.15, %], observándose diferencias significativas entre los tres grupos a los 6 meses de tratamiento ($P<0.001$), una reducción RLA del 89.58% (RIQ (-) 95.52 – 78.21, %) y una estabilización linfocitaria (mediana 4.48, RIQ 2.63 – 14.95, $\times 10^9/L$) a partir del mes 12 (Figura 4.17) (Anexo 2: Tabla 13).

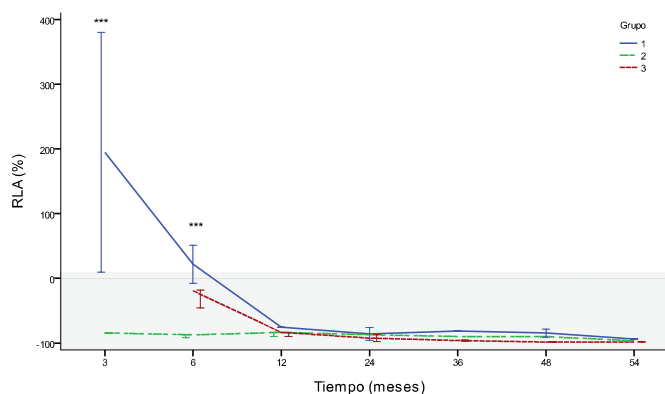


Figura 4.17 Cinética diferencial en el cambio del RLA durante el tratamiento con Ibrutinib. La clasificación de los pacientes en cada grupo se calculó en base a la diferencia en el RLA en función del valor RLA de la muestra pretratamiento (valor 0): grupo 1 (ΔRLA (%) >1); grupo 2

(Δ RLA (%) <0,50); grupo 3 (Δ RLA (%) 0,5-1) (decaimeto exponencial $y=27.13e^{(-1.82t)}$). Pacientes con LLCP excluidos de la agrupación (* $P<0.05$). (RLA: recuento linfocitario absoluto; Δ : diferencia).

El grupo 1 (n=11) lo conformaron pacientes jóvenes (media 63 años), en su mayoría mujeres (64%), con M-LLC y linfadenopatías (al menos un ganglio con el diámetro mayor > 2 cm, 64%), en el que la del(17p13)/TP53_{mut} fue minoritaria (36%). En este caso, la enfermedad voluminosa se asoció con una linfocitosis más prolongada, detectable hasta 6 meses desde el inicio del tratamiento. Por el contrario, los pacientes del grupo 2 (n=15) de perfil LLC-IPI alto/muy alto riesgo (73%), y con una prevalencia del 53% del(17p13)/TP53_{mut}, presentó U-LLC en la mayoría de los casos (73%), y un menor componente adenopático (27%). En cambio, el grupo 3 (n=8), con una linfadenopatía moderada (62%), tuvo un aclaramiento más rápido de la linfocitosis en comparación con el grupo 1.

4.3.4.3 Patrón de crecimiento en el seguimiento y la respuesta al tratamiento.

Se evaluó la dinámica clonal de 19 pacientes de los 25 con mutaciones genéticas en la muestra inicial, teniendo en cuenta un seguimiento mínimo de 12 meses, en el que se observaron dos patrones diferenciados en función de la respuesta clínica. El primer patrón lo caracterizó el subgrupo de pacientes en respuesta global, en el que el RLA fue disminuyendo progresivamente al igual que el componente genético detectado en el estudio basal. En un sólo caso, LLC-49, tres de las seis variantes fueron persistentes a los 3 años aunque con una clara tendencia CCF en disminución [CCF (-1.54)-(-3.12)], mientras que en el resto de pacientes el CCF fue indetectable (Anexo 1: Figuras 7).

El segundo patrón fue descrito en 6 pacientes con linfocitosis persistente (RP) como patrón de evolución lineal. Se caracterizó por un mantenimiento de RLA entre los 12 y 48 meses de seguimiento, acompañado por un cambio (LLC-37) o al menos un equilibrio en la arquitectura y frecuencia clonal progenitoria (LLC-15) (Anexo 1: Figuras 8). LLC-37 fue el único paciente en RP que no mantuvo el componente genético inicial, con la aparición de una CCF adquirida en el gen *SF3B1*, y una estabilidad del CCF del 66%, al año de seguimiento (Figura 4.18). En otros casos, algunas mutaciones fueron indetectables en ciertos puntos del seguimiento, mientras que otras estuvieron presentes en todos los puntos a CCF estables incluso aumentados (LLC-2, LLC-7 y LLC-97). La mutación clonal en el gen *NOTCH1*, en el paciente LLC-84, presentó CCF indetectable al año de tratamiento, aunque a pesar de una disminución del 94% de RLA (111.84 vs $6.82 \times 10^9/L$), el componente linfocitario seguía siendo persistente a los 4 años de terapia (Figura 4.18).

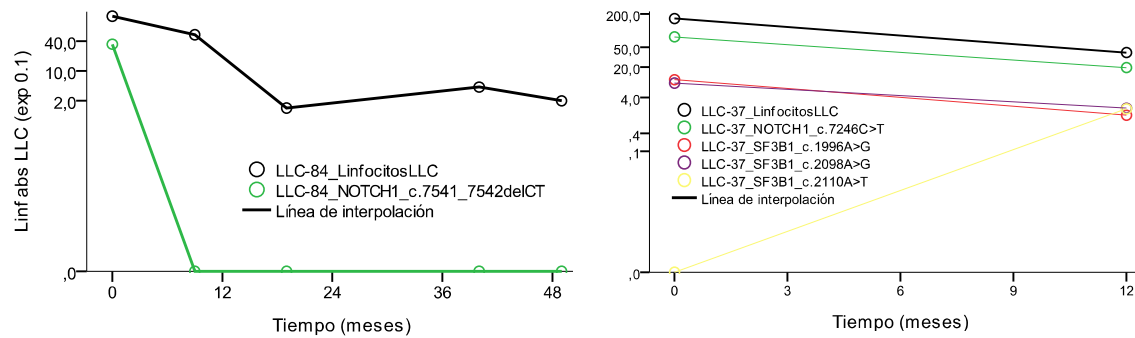


Figura 4.18 Patrón de evolución lineal. Modelo de distribución de los linfocitos absolutos LLC (exp 0.1) en función del tiempo (meses), según la proporción de CCF de cada variante (CCF multiplicado por el número de células LLC circulantes en SP), para los casos LLC-84 (izquierda) y LLC-37 (derecha). Aparición CCF adquirida SF3B1:c.2110A>T en LLC-37 a los 12 meses. LLC-84 con linfocitosis persistente aunque CCF indetectable de la mutación inicial. (Linf abs LLC: linfocitos absolutos LLC unidades $\times 10^9/L$).

Un caso particular fue LLC-91, caracterizado por un cambio significativo en el CCF, en al menos un subclon no descrito en la evaluación molecular inicial. Al caracterizar por NGS los genes *BTK* y *PLCG2*, se detectó la variante adquirida en el exón 15 del *BTK*:p.Cys481Ser con un VAF 25.90%. Se demostró su aparición 6 meses antes de cualquier evidencia clínica de enfermedad recidivante y en este caso, transformación a linfoma agresivo, al mantener RLA en recuentos normales (linfocitos LLC absolutos 1.10×10^9) y no mostrar sintomatología, adenopatías ni megalias palpables. Este clon de LLC en crecimiento se compuso además por dos variantes adicionales en el gen *FBXW7* de nueva aparición, demostrando una evolución convergente al coevolucionar múltiples subclones que albergaban diferentes mutaciones en el mismo gen (Figura 4.19).

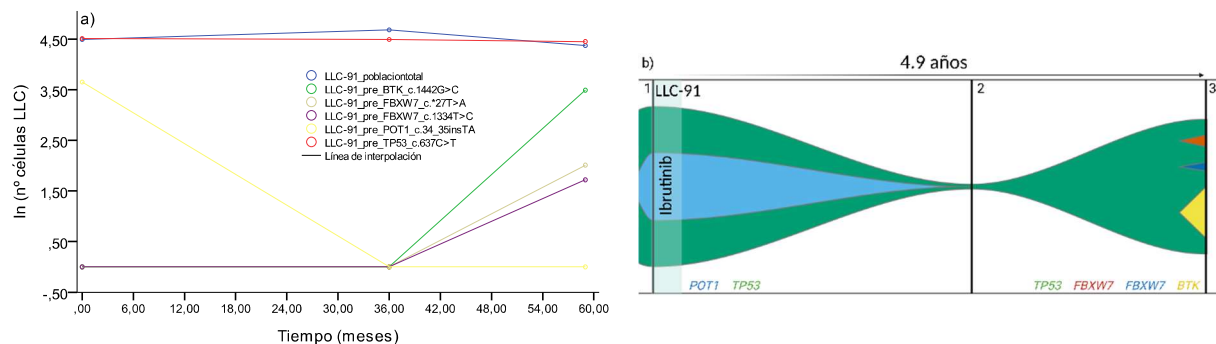


Figura 4.19 Patrón de evolución ramificada, caso LLC-91. A) Modelo de distribución de los linfocitos absolutos LLC (exp 0.1) en función del tiempo (meses), según la proporción de CCF de cada variante (CCF multiplicado por el número de células LLC circulantes en SP) (Linf abs LLC: linfocitos absolutos LLC unidades $\times 10^9/L$). B) Gráfico FishPlot representando la dinámica y la arquitectura clonal del paciente durante el seguimiento de la enfermedad, con los valores VAF (%) de cada variante (Fishplot R v.3.2.2, The R Fundation, Miller et al., 2016).

4.3.4.4 Evolución clonal y enfermedad mínima residual.

La carga de LLC cuantificada por citometría de flujo a los 6 y 12 meses, y en puntos anuales posteriores, disminuyó significativamente en SP. Pasado el primer año, la carga de la enfermedad fue de 22.51×10^{-1} células LLC/leucocito (RIQ, 3.94×10^{-2} - $57,60 \times 10^{-1}$), mientras que la mediana de EMR a los 2 años disminuyó a 9.44×10^{-2} células LLC/leucocito (RIQ, 3.37×10^{-2} - 18.27×10^{-1}). A los 3 años de tratamiento, se detectó una mediana de EMR de 8.85×10^{-2} células LLC/leucocito (RIQ, 1.57×10^{-2} - 12.69×10^{-1}) alcanzando su mínimo a los 4 años con de 2.88×10^{-2} células LLC/leucocito (RIQ, 1.22×10^{-2} -

4.64×10^{-2}) ($P < 0.001$) (Figura 4.20). En concreto, la EMRi ($< 10^{-4}$) se logró únicamente en 2 (LLC-6 y LLC-121, 5%) de 39 casos en SP al año de tratamiento, sin adenopatías ni megalias persistentes. En base a las características clonotípicas IGVH, los pacientes M-LLC tenían significativamente más enfermedad residual que los pacientes con U-LLC (mediana 33.70×10^{-1} , RIQ 3.04×10^{-2} - 64.10×10^{-1} vs 12.77×10^{-1} , RIQ 3.94×10^{-2} - 47.71×10^{-1}) en los primeros 12 meses, manteniéndose esta diferencia en los años subsecuentes ($P < 0.001$) (Figura 4.20).

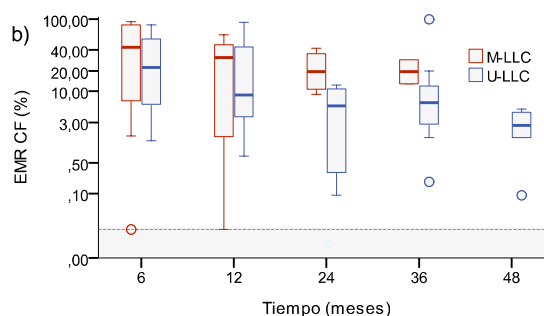


Figura 4.20 Evaluación de EMR en SP a distintos tiempos en la cohorte de pacientes tratados con Ibrutinib, en función del estado mutacional IGVH (M-LLC en rojo y U-LLC en azul). Escala potencial (exponente 0.1) para mostrar los valores EMR en %, en el que un valor 0.01% corresponde a EMRi (10^{-4}), área representada en gris. No representados los pacientes en recaída (CF: citometría de flujo; EMR: enfermedad mínima residual; M-LLC: IGVH mutado; U-LLC: IGVH no mutado).

Con independencia del nivel de EMR alcanzado, las diferencias no fueron significativas entre los pacientes con EMRi y el resto de subgrupos en cuanto a SG (no alcanzada la mediana en ninguno de los subgrupos, $P = 0.841$) (Figura 4.21). De la misma forma, independientemente de las características propias o clínicas basales del paciente, tales como, la edad, grupos de riesgo LLC-IPI, valores atípicos de B2-microglobulina, o el estadio Binet avanzado (B+C), así como la CCF observada en la última muestra de seguimiento, no se correlacionaron ni influyeron en la profundidad de la respuesta.

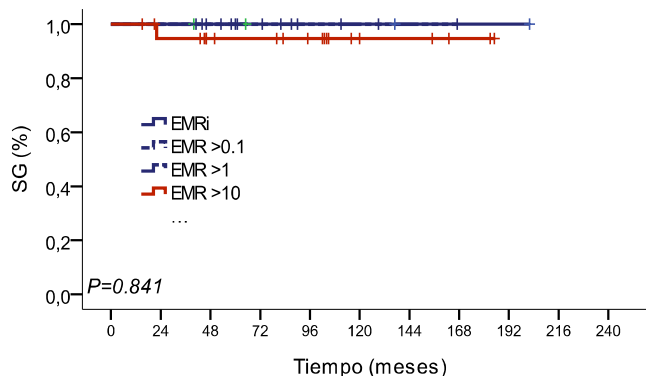


Figura 4.21 Supervivencia global en función de la profundidad de respuesta alcanzada en la cohorte de pacientes tratados con Ibrutinib. (EMRi: indetectable $< 10^{-4}$; EMR > 0.1 : $> 10^{-3}$; EMR > 1 : $> 10^{-2}$; EMR > 10 : $> 10^{-1}$).

Una tendencia en aumento de la EMR medida por CF, al comparar al menos dos muestras de seguimiento, se asoció con una mayor probabilidad de recaída ($P < 0.001$). De manera exclusiva, los tres casos (LLC-23, LLC-38 y LLC-91) que desarrollaron transformación a Síndrome de Richter (a los 6 meses, 3 años y 5 años del tratamiento con Ibrutinib, respectivamente), presentaron un aumento de la EMR durante el seguimiento de la LLC. En ningún caso la EMR $< 10^{-1}$ en los puntos de seguimiento,

cuantificándose un aumento 10.8% y 38.5% de EMR en LLC-91 y LLC-38, respectivamente, previa a la recaída.

4.3.5 Análisis de supervivencia: esquema terapéutico en primera línea de tratamiento.

Los pacientes tratados con Ibrutinib en primera línea hasta progresión o toxicidad, consiguieron un incremento significativo de la SLP en todos los grupos de riesgo. La mediana SLP siguió sin alcanzarse tras 5 años de seguimiento, frente a la mediana SLP de 50 meses en la cohorte tratada con IQT (mediana, NA vs 50 meses, $P<0.001$) (Figura 4.22 a)). El 91.9% (34/37) de las recaídas, tuvieron lugar en el grupo tratado con IQT ($P<0.001$), mientras que la cohorte de pacientes tratados con Ibrutinib alcanzó unas tasas de SLP del 92% (3/39) [HR, 0.16; IC 95%, 0.049-0.526, $P<0.003$]. El beneficio de ibrutinib frente a IQT, se mantuvo en todos los subgrupos de análisis según las características propias del paciente o clínicas basales, tales como, la edad, así como LLC-IPI en estadios avanzados, U-LLC, presencia de adenopatías y megalias, valores atípicos de B2-microglobulina, o el estadio Binet avanzado (B+C) (Tabla 4.15).

Respecto a las características citogenéticas y moleculares, no se observaron diferencias significativas en SLP de los pacientes tratados con Ibrutinib, con presencia o ausencia de del(17p13)/TP53_{mut} (mediana, NA vs 59 meses, $P=0.617$), e independientemente del estado mutacional IGVH (mediana no alcanzada en ningún grupo, $P=0.434$), a los 5 años de seguimiento. En cambio, la SLP fue superior en comparación con la IQT, tanto en el grupo de pacientes U-LLC (60% frente a 25%) como M-LLC (100% frente a 60%), (HR, 0.10; IC 95%, 0.025-0.450, $P=0.002$) (Figura 4.22 b)). A los 5 años, las tasas de SLP fueron más altas para Ibrutinib que para IQT en pacientes con del(11q22) (60% frente a 30%) y sin del(11q22) (100% frente a 30%, no se produjeron recaídas o muertes en pacientes con Ibrutinib sin del(11q22)) (HR, 0.49; IC 95%, 0.324-0.761, $P=0.001$). El bajo número de pacientes con del(17p13)/TP53_{mut} (2/57, 3%) en la cohorte tratada con IQT, impidió su comparación y un análisis significativo de la SLP (Figura 4.22 c)).

La SG fue del 92% para los pacientes con Ibrutinib y del 79% para los pacientes con IQT (Figura 4.22 d)), sin detectarse diferencias significativas en este caso (HR, 0.29, IC 95%, 0.04-2.33, $P=0.244$). Todos los pacientes con IQT en recaída, recibieron distintas líneas terapéuticas posteriores, entre los que se encontraron agentes dirigidos.

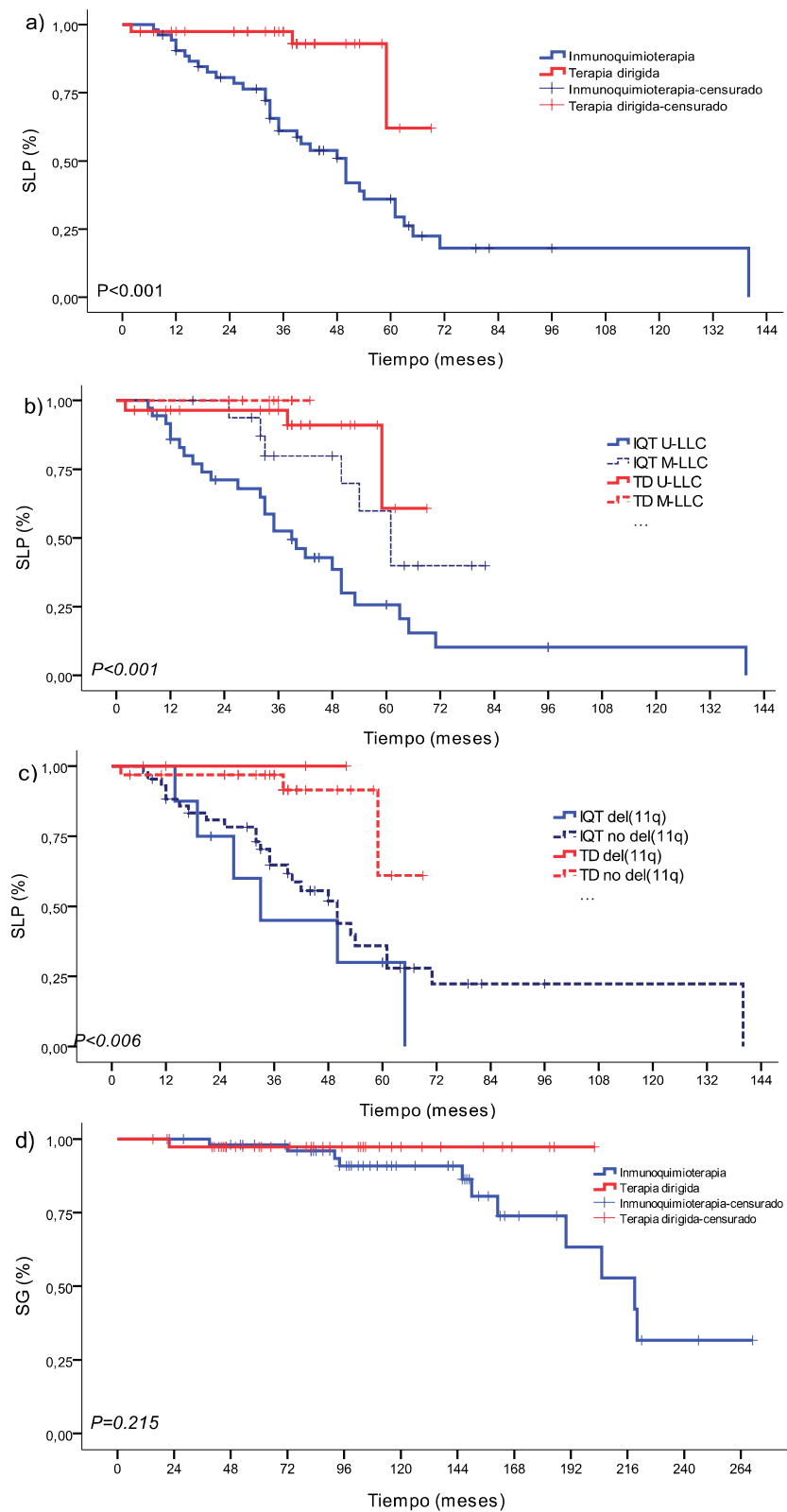


Figura 4.22 Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión y supervivencia global entre todos los pacientes tratados con Ibrutinib e IQT como primera línea de tratamiento. a) SLP según la cohorte tratada con IQT o Ibrutinib; b) SLP en función del estado mutacional IGVH M-LLC y U-LLC; c) SLP según la presencia o ausencia de del(11q22); d) SG según la cohorte tratada con IQT o Ibrutinib ($P < 0.05$).

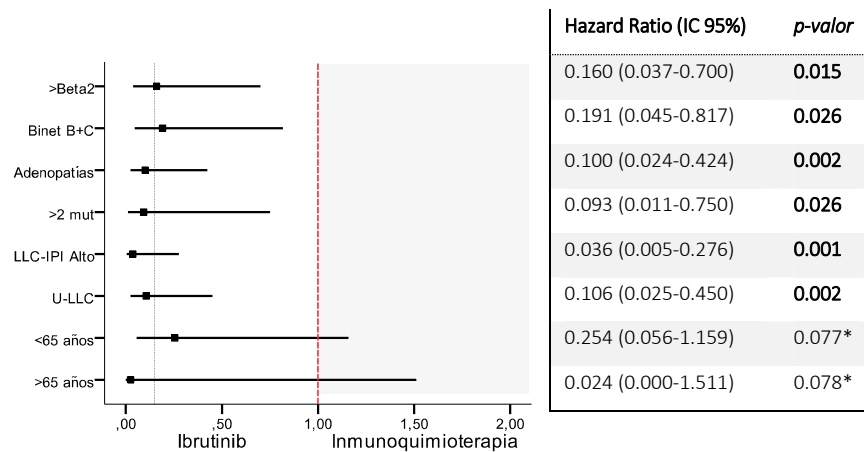


Tabla 4.15 Análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) en función del tratamiento en primera línea. Forest plot (izquierda), con los valores Hazard ratio (cuadrado) e intervalos de confianza (IC 95%) según los subgrupos de pacientes en función de los valores atípicos de beta2-microglobulina (Beta2), presencia de adenopatías, LLC-IPI de alto/muy alto riesgo, >2 mutaciones genéticas detectadas, U-LLC y edad. (Hazard ratio estimado con el modelo de regresión univariante de Cox) ($P < 0.05$; * $P > 0.05$ potencialmente significativo).

Se alcanzó EMRi en el 27% (15) de los pacientes tratados con IQT, mientras que se redujo al 5% (2) en los casos tratados con Ibrutinib ($P < 0.001$) a los 14 meses de seguimiento. A pesar de esto, la SLP de los pacientes con EMR positiva fue significativamente mayor (63%) en los pacientes tratados con Ibrutinib, en comparación con el 18% en la cohorte tratada con IQT a los 5 años de seguimiento (mediana 33 meses IQT EMR+; NA en el resto de subgrupos) (HR, 4.73, IC 95%, 2.43-9.19, $P < 0.001$) (Figura 4.23).

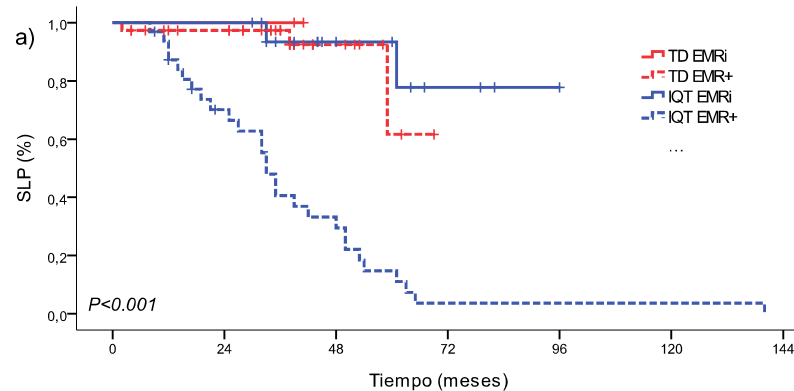


Figura 4.23 Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión entre todos los pacientes tratados con Ibrutinib e IQT al evaluar la EMR por citometría de flujo. Si EMRi $< 10^{-4}$ y EMR positiva rango $> 10^{-1} - 10^{-3}$ (células LLC/leucocito) (TD: terapia dirigida; IQT: inmunoterapia; EMR: enfermedad mínima residual; EMRi: EMR indetectable; EMR+: EMR positiva).

4.4 Evaluación del estado mutacional de IGVH por NGS.

4.4.1 Seguimiento del clon mayoritario en las muestras secuenciales por NGS.

En el seguimiento del clonotipo por NGS se seleccionaron 127 secuenciales, 47 muestras de 23 casos con IQT (40%) y 80 muestras de 35 casos tratados con Ibrutinib (60%). Para cada subgrupo, la media de secuencias analizadas por paciente fue 112885 (rango, 1471- 1427745), y 118308 (rango, 1000-585659), respectivamente. El recuento medio del clonotipo mayoritario fue 104823 (rango, 0-

1427019), y 48288 (rango, 0-488194), siendo 25.85% y 80.46% la media de lecturas mapeadas en el gen V (rango, 0.00-99.95% para IQT, 0.00-99.98% para Ibrutinib).

Del subgrupo de pacientes con IQT, el reordenamiento principal no fue detectado en el 34% de las muestras (19/56) con una media de lecturas mapeadas IGVH de 143439 (rango, 101221-313124). En el 5% (3/56) el ratio de lecturas del clonotipo con respecto al total no superó el 1% (rango, 0.32-0.91%), mientras que en el 29% (16/56) se mantuvo a más del 18% (rango, 18.11-99.95%). El 100% (19/19) de los casos con NGS IGVH indetectable, entraron en RC, mientras que el 81.3% (13/16) con NGS IGVH>10%, presentaron recaída de la enfermedad ($P<0.001$) (Figura 4.24 a)). Por el contrario, del subgrupo de pacientes tratados con Ibrutinib, únicamente en el 3% de las muestras (2/80) el clonotipo inicial no se detectó, ambas procedentes del mismo caso LLC-121. Del resto, a pesar de excluir 28 (35%) muestras con linfocitosis persistente (media 31.04, rango, 5.56- 159.63 $\times 10^9$ /L), en 50 (62%) el valor de ratio NGS IGVH>14%, con un RLA medio de 2.95 (rango, 0.90- 4.98 $\times 10^9$ /L).

Al evaluar el seguimiento clonal NGS IGVH de los casos LLC-44 y LLC-63 tratados con IQT, ambos con doble reordenamiento, la tendencia fue diferencial (18 muestras de 2 pacientes) (Figura 4.24 b)). Los reordenamientos productivos, fueron indetectables por NGS, mientras que la ratio de los no productivos, incrementó secuencialmente. La ratio del reordenamiento LLC-44, IGVH3-23/IGDH3-22/IGJH4, no bajó del 18%, mientras que la ratio mínima para el LLC-63, IGVH4-34/IGDH3-10/IGJH4, fue del 2%. En consonancia, a pesar de que el RLA se mantuvo invariable en ambos casos [LLC-44, media 8.51 ($\times 10^9$ /L), error estándar (σ) 0.36; LLC-63, media 5.32 ($\times 10^9$ /L), $\sigma=0.54$], el valor cellLC(%) aumentó hasta representar el 6% y 8% de leucocitos totales, respectivamente. En cambio, el comportamiento observado en los reordenamientos no productivos en los pacientes tratados con TD (ejemplo LLC-43 y LLC-60), seguía la misma tendencia que el reordenamiento productivo (Figura 4.24 c)). En todos los casos ambos reordenamientos fueron detectables por NGS, y dibujaron la misma dinámica de aumento o disminución en paralelo, en términos de ratio y cellLC(%) en las muestras secuenciales.

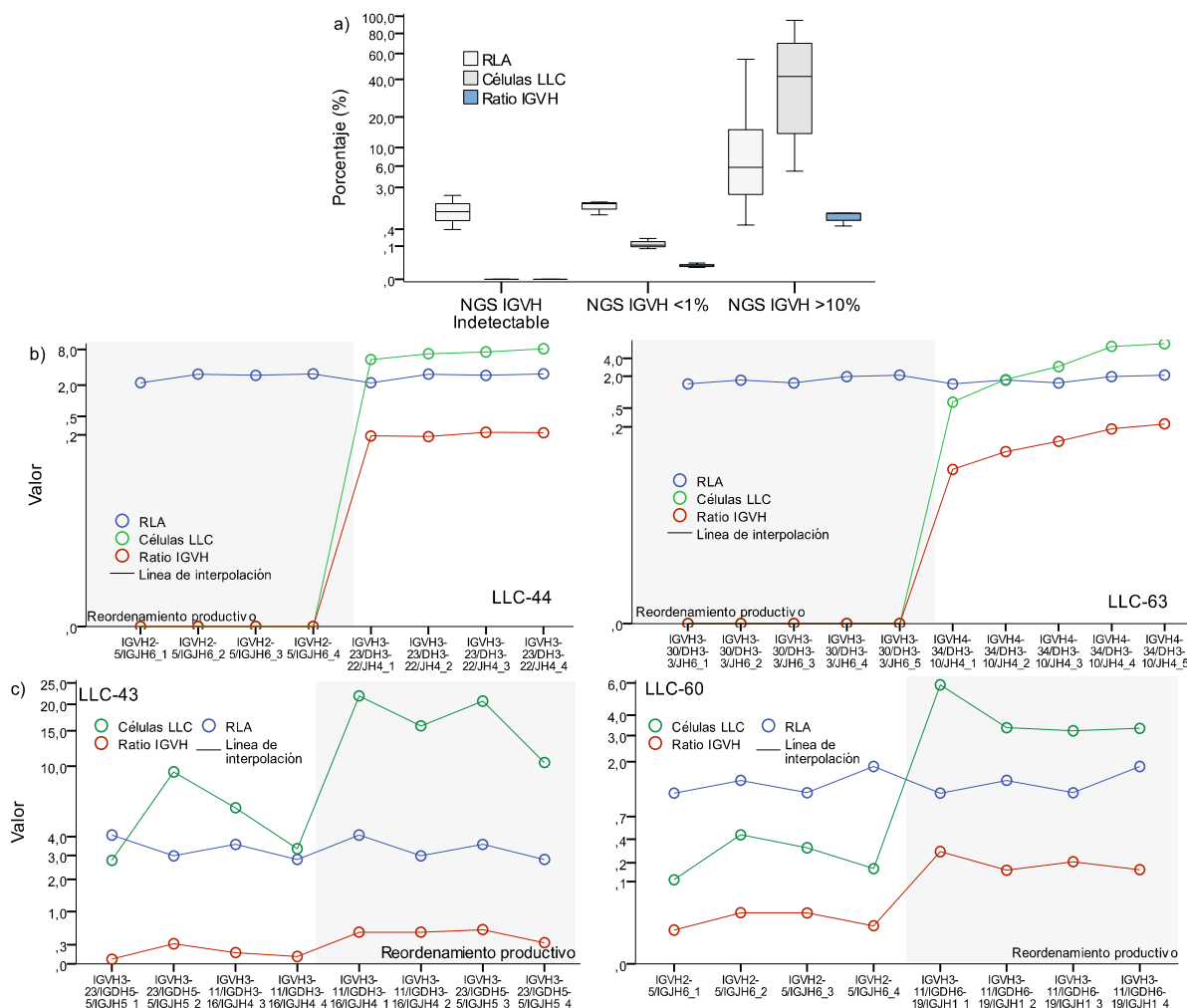


Figura 4.24 Seguimiento clonotípico por NGS. A) Representación en diagrama de cajas que muestra el ratio (tanto por 1), el recuento células LLC [celLLC(%)], y el valor de RLA según los subgrupos de pacientes con IGVH indetectable, IGVH<1%, o >10%. Las diferencias fueron significativas entre el valor de cada subgrupo ($P<0.001$). B) Gráficas de dispersión que muestran la dinámica de RLA, celLLC(%), y el ratio (%), en función de cada uno de los reordenamientos detectados en las muestras secuenciales de los casos LLC-44 y LLC-63 tratados con IQT c) y de los casos LLC-43 y LLC-60 tratados con TD. (RLA: recuento linfocitario absoluto ($\times 10^9/L$)).

4.4.2 Detección de la enfermedad mínima residual por CF e IGVH NGS.

La comparativa entre la EMR por NGS y CF, se acotó a 42 pacientes tratados únicamente con IQT en primera (39/42, 93%) o sucesivas líneas terapéuticas (3/42, 7%), a partir de 67 muestras de seguimiento en distintas etapas de la enfermedad con dato CF disponible. Treinta y cuatro (81%) presentaron un único clonotipo mayoritario en la muestra inicial, mientras que 8 (19%), tenían doble reordenamiento. En el estudio por NGS, la mediana de secuencias analizadas por paciente fue superior a 148381 (rango, 1897- 1845191), mientras que el recuento medio del clonotipo mayoritario fue 111219 (rango, 0- 1838804), siendo 48.68% la mediana de lecturas mapeadas en el gen V (rango, 0.00-99.98%).

Para la medición de la EMR por NGS, se requirió la detección de la misma composición clonotípica IGVH-DH-JH detectada en la muestra basal. Hubo una concordancia aceptable (>90 %) en el umbral de <0,010% ($<10^{-4}$) con 2/21 discrepancias, en las que la NGS siguió detectando el clonotipo

inicial (clonotipo LLC-70, ratio 0.4%; clonotipo LLC-79, ratio 0.9%) (Figura 4.25 y Figura 4.26). Con una mediana de 4.77 (RIQ, 3.24-6.10 $\times 10^9/L$) recuento leucocitario total, y RLA de 1.09 (RIQ, 0.75-1.59 $\times 10^9/L$), para el caso LLC-70 se detectaron 1.11×10^{-4} células LLC/leucocito, y LLC-79 2.01×10^{-4} células LLC/leucocito en base al cálculo por NGS. Estas dos muestras, negativizaron a EMRi por ambas técnicas en la posterior muestra de seguimiento. En todas las muestras con una EMR entre rango $<10^{-4}$ - 10^{-4} por NGS, el valor promedio de la máxima diferencia interreordenamiento fue $-1.25 \times$ [rango, (-0.27) – (-2.03)], siendo categorizados en todos los casos como reordenamientos policlonales.

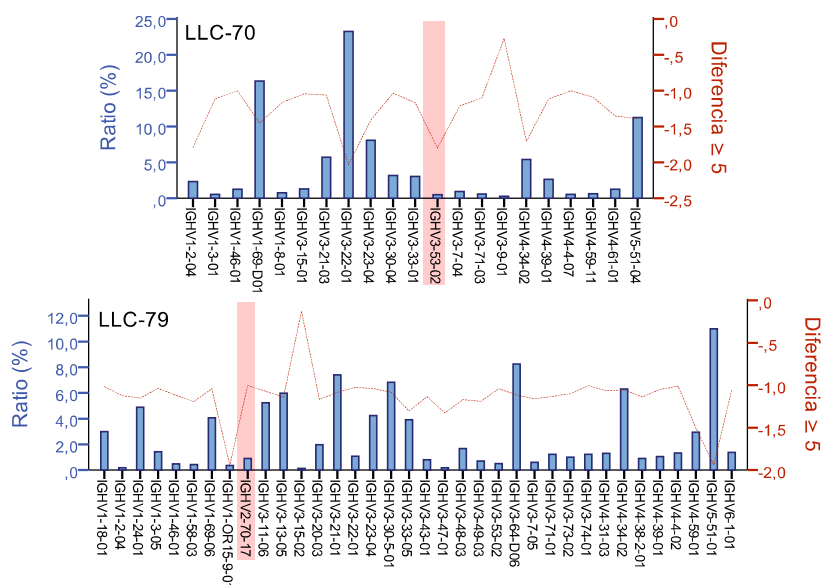


Figura 4.25 Distribución clonal de los diferentes reordenamientos IGVH al evaluar la EMR por NGS. Gráfico de barras LLC-70 y LLC-79 con EMR $>10^{-4}$ por NGS, pero con distribución policlonal (línea discontinua roja, eje derecho) en la que el clonotipo inicial (sombreado en rojo) no supera el 0.4% y 0.9% (eje izquierdo) de las lecturas totales mapeadas en la región IGH.

Al evaluar las muestras (16/67) de los casos con doble reordenamiento, la EMR fue indetectable ($<10^{-4}$) en 11 muestras por CF de 3 pacientes. Esta concordancia fue del 100% (11/11) según el porcentaje de EMR alcanzado por NGS pero únicamente en el seguimiento del clonotipo productivo, mientras que la mínima para los no productivos fue de 0.020%.

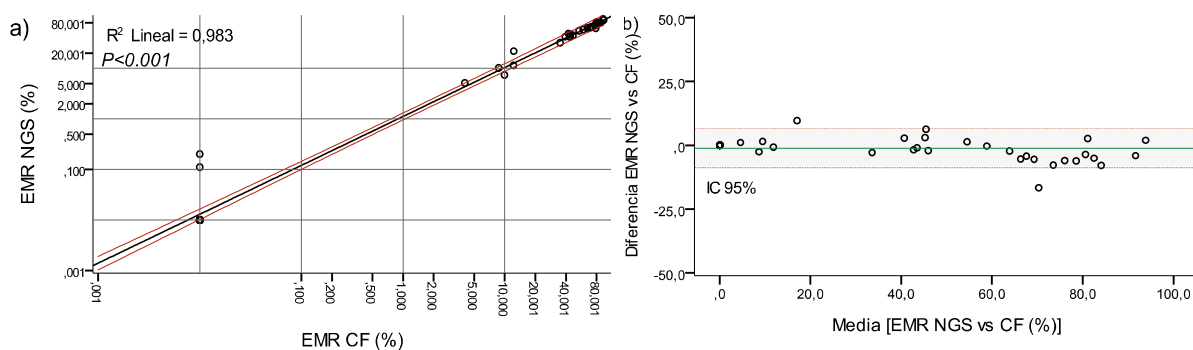


Figura 4.26 Comparación EMR (%) por CF y NGS. Correlación de Pearson (a) y gráfico de Bland-Altman (b) entre los métodos NGS y FC (linealidad=0.983; coeficiente de correlación de Pearson $R=0,667$, $P<0,001$). En la gráfica de dispersión a) las cuadrículas delimitan las regiones EMR, siendo EMR $<10^{-4}$ (0.001-0.01); EMR 10^{-4} (0.01-0.1); EMR 10^{-3} (0.1-1); EMR 10^{-2} (1-10); EMR 10^{-1} (10-100). (CF: citometría de flujo; EMR $>10^{-2}$: IC: intervalo de confianza).

4.5 Evolución clonal subyacente a la progresión de la LLC y transformación Richter.

Se estudió la evolución clonal de la enfermedad a largo plazo de 31 (84%) pacientes en recaída a la IQT como primera línea, a partir de las muestras secuenciales obtenidas tras sus posteriores intervenciones terapéuticas (mediana 3, rango 2 – 8 líneas de tratamiento). Veintitrés casos (62%), fueron tratados con dos líneas de tratamiento, 3 (16%) con una tercera y cuarta línea, 2 (5%) con seis, 1 (3%) con siete y 1 (3%) con ocho líneas.

Sobre los cambios de CCF dependientes del tiempo, cuando los cambios significativos de VAF (%) eran unidireccionales, estos patrones de evolución se clasificaron como coevolución o evolución lineal. Este tipo de patrón se observó en pacientes con evolución progresiva en disminución (LLC-97) en los que los componentes clonales fluctuaron en distribución entre clones primarios y los secundarios (Figura 4.27). Las LLC en recaída mostraron una tendencia hacia una evolución ramificada, al observarse diferentes cambios significativos en aumento, disminución y en aparición concomitantemente en CCF entre muestreos consecutivos y, por lo tanto, fueron bidireccionales, como en los casos LLC-82 y LLC-85. Asimismo, en fases anteriores a la recaída, la coevolución pareció menos frecuente, observándose en dos únicos casos (LLC-19 y LLC-61) (Figura 4.28).

Durante el curso clínico de seis pacientes no tratados a largo plazo (*watch and wait*, mediana, 5.4 años) y sin mutaciones genéticas asociadas en la muestra basal, ocurrieron cambios sustanciales en la composición clonal solo después del tratamiento con IQT. Estos cambios dieron como resultado la evolución de uno o pocos subclones en tres casos (LLC-43, LLC-54 y LLC-55), mientras que hasta tres variantes genéticas aparecieron simultáneas en otros tres (LLC-60, LLC-82 y LLC-85), indicativas de evolución ramificada (Figura 4.28). El 64% (7/11) de las CCF adquiridas se localizaron en el gen *TP53*, mientras que la adquisición secuencial de alteraciones cromosómicas condujo a una mayor inestabilidad genética, detectándose del(17p13) y trisomía 12 *de novo*, CCF aumentado de del(11q22) y del(13q14) por FISH, y cariotipos con CCF estable (3, 50%) o no alterados. Todos estos factores aumentaron el riesgo de progresión de la enfermedad, con una mediana de tiempo hasta la primera recaída de 3.6 (rango, 2.5-4.5 años) y de 2.2 años (2.4 y 2 años, en LLC-55 y LLC-60, respectivamente) hasta la segunda.

Diez pacientes fueron pretratados con una mediana de 2 (rango: 1-6) líneas de tratamiento previas a Ibrutinib, y con un seguimiento medio hasta la recaída de 27 meses (RIQ, 15.0-53.5 meses). Se estudiaron todas las muestras secuenciales (30) para determinar el punto temporal más temprano en la historia clonal en el que las mutaciones obtuvieron una ventaja selectiva, marcándose a los 3.4 años de seguimiento (rango, 2-5.25 años) ante la aparición de la mutación adquirida *BTK* Cys481Ser en dos pacientes (LLC-64 y LLC-91) con un rango de VAF amplio (7.37-25.9%) (Figura 4.29). En ningún caso, se detectaron variantes en el gen *PLCγ2*.

Las *BTK_{mut}* ocurrieron simultáneamente con anomalías dobles de del(17p13)/*TP53* en el caso LLC-64 y *TP53_{mut}* simple en LLC-91. Desde la perspectiva de *BTK*, esta asociación fue del 100%, en la que todos los pacientes *BTK_{mut}* portaban una mutación *TP53*, mientras que ningún caso presentó evolución convergente en *BTK*, ni asociaciones estadísticamente significativas entre la presencia de *BTK_{mut}* y el número de líneas de tratamiento previas (0 ó 1 vs ≥ 2). Además, desde el pretratamiento hasta la recaída de la enfermedad, los clones del(17p13)/*TP53* se expandieron con CCF en aumento, permanecieron estables (CCF estable) o incluso disminuyeron (CCF disminuido) en el estudio temporal, mientras que los clones *BTK* siempre se expandieron (CCF en aumento). El resto de genes *driver* fueron heterogéneos y variaron de un paciente a otro.

La progresión molecular de la enfermedad de estos dos pacientes precedió a la recaída clínica. Este hallazgo también se observó en el caso LLC-62, en el que la *BTK_{mut}* se detectó a los tres años de seguimiento, al igual que la mutación *missense de novo* en *TP53*, pese a que no había sospecha de recaída clínica por el momento. Es por ello, por lo que a pesar de que la asociación de la recaída con la aparición de la resistencia en *BTK_{mut}* fue significativa (2/2, $P=0.036$), y potencialmente con la adquisición de mutaciones en *TP53* (6/10, $P=0.093$), la detección de *BTK_{mut}* no afectó en la SLP y SG en la cohorte estudiada.

El caso LLC-91, desarrolló síndrome de Richter tras la recaída a Ibrutinib, en el que la relación clonal entre la LLC en el momento del diagnóstico, en el momento de la resistencia a Ibrutinib y después de la transformación a Richter, se confirmó mediante la identificación de un reordenamiento idéntico del gen IGVH y un segmento del gen IGVH3-30/IGDH6-13/IGJH4 no mutado en todas sus muestras analizadas como único reordenamiento clonal. Un caso más (LLC-68), sin huella molecular basal ni tras la recaída, se transformó a Richter con una evolución clonalmente relacionada, en el que otros reordenamientos productivos o no productivos basales no cogieron protagonismo en ninguna muestra secuencial.

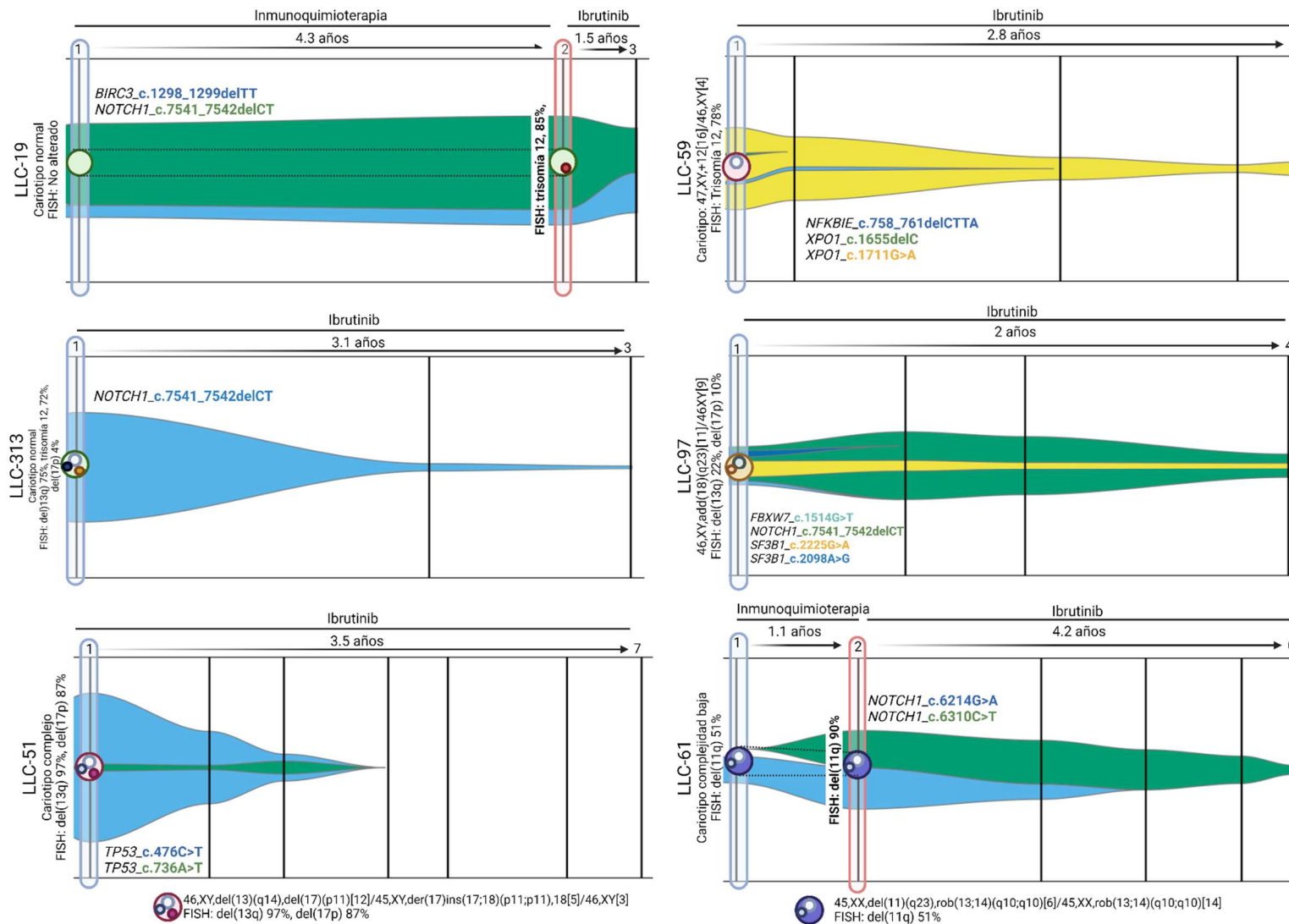


Figura 4.27 Patrones de evolución clonal. Gráficos FishPlot representando la arquitectura clonal de 4 pacientes ejemplo (LLC-313, LLC-51, LLC-59, y LLC-97) con evolución lineal tras una línea de tratamiento y el patrón tras la recaída (LLC-19 y LLC-61). Áreas: VAF (%) de la mutación detectada; líneas verticales negras: muestras de seguimiento con datos genéticos; línea vertical azul: muestra pretratamiento; línea vertical roja: momento de recaída clínica; formas circulares: representación celular con datos citogenéticos.

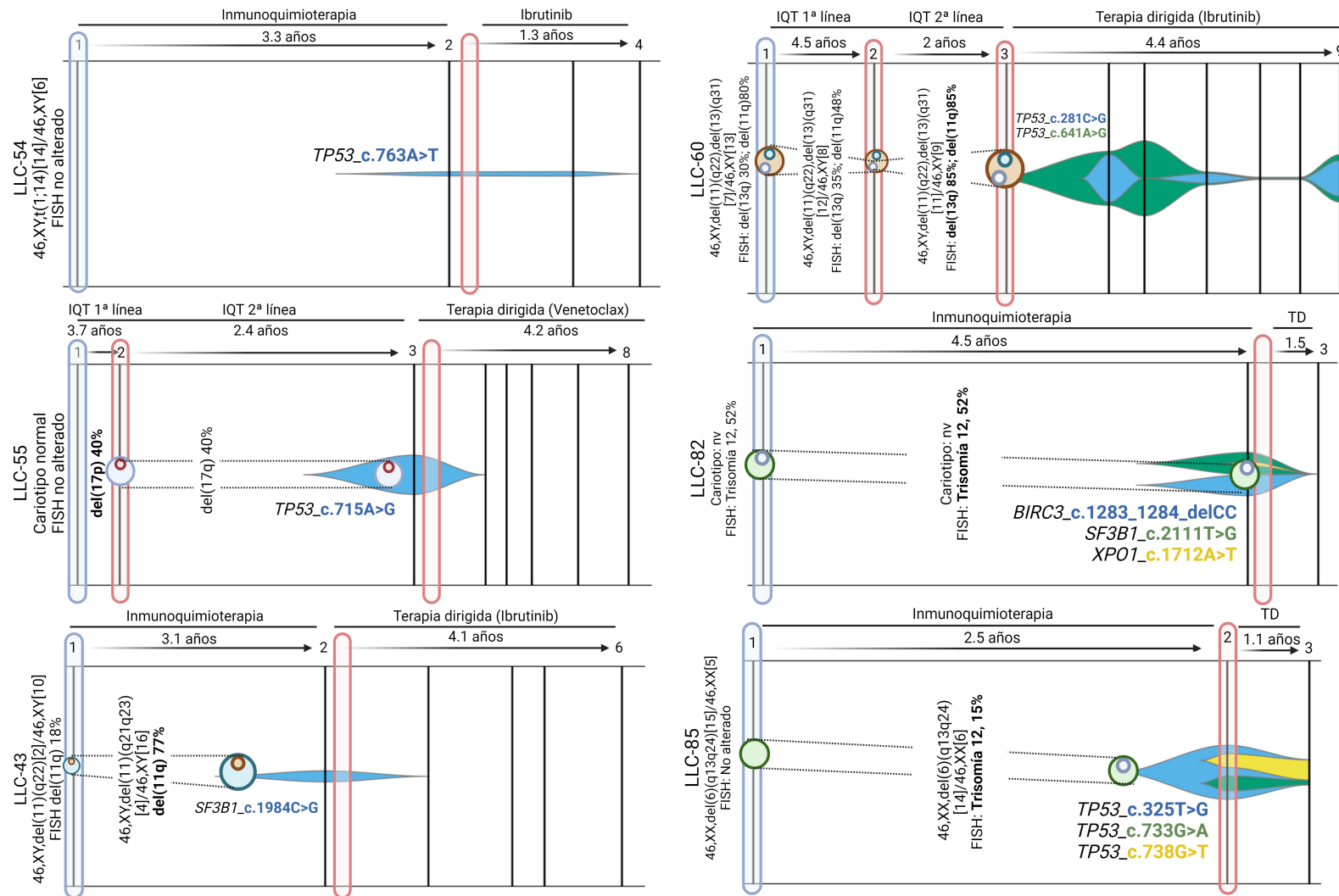


Figura 4.28 Disección de la evolución clonal mediante el perfil mutacional temporal en pacientes tratados en primera línea con IQT. Gráficos FishPlot representando la arquitectura clonal de 6 pacientes LLC (LLC-54, LLC-55, LLC-43, LLC-60, LLC-82, LLC-85) sin mutaciones pretratamiento y con evolución clonal tras primera línea IQT (izquierda coevolución o evolución lineal; derecha, evolución ramificada). Áreas: VAF (%) de la mutación detectada; líneas verticales negras: muestras de seguimiento con datos genéticos; línea vertical azul: muestra pretratamiento; línea vertical roja: momento de recaída clínica; formas circulares: representación celular con datos citogenéticos (IQT: inmunoterapia; nv: no valorable; TD: terapia dirigida).

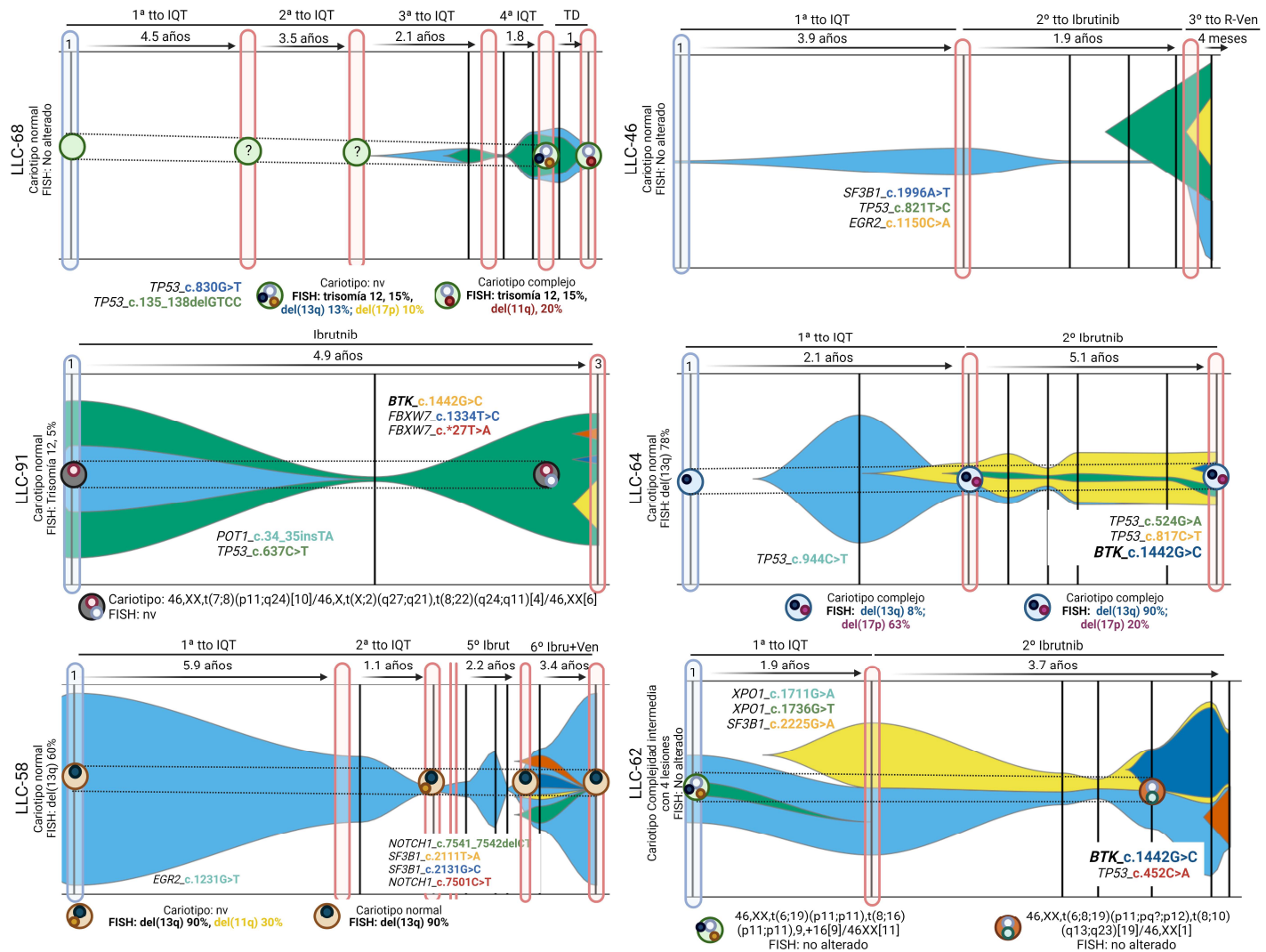


Figura 4.29 Evolución clonal y resistencia a Ibrutinib. Gráficos FishPlot representando la arquitectura clonal de pacientes en recaída (LLC-46, LLC-58, LLC-64), y de los que desarrollaron Síndrome de Richter tras Ibrutinib (LLC-68 y LLC-91). En el caso LLC-62 se evidenció la presencia de dos mutaciones adquiridas, una de ellas en el gen *BTK*, sin sospecha de recaída clínica hasta el momento. Áreas: VAF (%) de la mutación detectada; líneas verticales negras: muestras de seguimiento con datos genéticos; línea vertical azul: muestra pretratamiento; línea vertical roja: momento de recaída clínica; formas circulares: representación celular con datos citogenéticos (Ibrutinib; IQT: inmunoterapia; nv: no valorable; R-Ven: Rituximab+Venetoclax; TD: terapia dirigida; Tto: tratamiento Ven: Venetoclax).

Discusión

5 Discusión

La evolución clonal es el proceso natural a través del cual las células buscan continuamente ventajas fenotípicas que les permitan expandirse dentro de las limitaciones del microambiente. Según el modelo propuesto por Peter Nowell en 1976, la adquisición de alteraciones genéticas y moleculares es el mecanismo habitual que utiliza la célula tumoral para alcanzar esa ventaja proliferativa sobre subpoblaciones clonales menos adaptadas, que muchas veces implica refractariedad a la terapia, o recurrencia de la enfermedad. Ahora bien, no en todos los casos de recidiva tumoral se documenta una evolución genética adicional que la justifique, de hecho, es poco frecuente por ejemplo en la Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Sin embargo, en otras neoplasias malignas, como la Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), es más probable que las mutaciones *de novo* desempeñen un papel crucial en la recurrencia del tumor (Nowell, 1976).

Es evidente que la selección clonal es un fenómeno que requiere tiempo para su implementación, y a este respecto la LLC ha resultado ser el modelo ideal por varias razones:

En primer lugar, el curso de la enfermedad típicamente prolongado en la LLC ha permitido descifrar la evolución clonal a través de un muestreo longitudinal frecuente durante años. La segunda, puesto que las células de LLC circulan continuamente de la sangre periférica y los compartimentos de los ganglios linfáticos y la médula ósea, el acceso a muestras secuenciales es sencillo; con una simple venopunción se obtiene material de gran pureza, lo que facilita el seguimiento estrecho de los procesos de evolución clonal. La tercera es la posibilidad de detectar estadios preleucémicos (linfocitosis B monoclonal), leucemia establecida, e incluso evolución a formas más agresivas como el linfoma de Richter.

Es cierto que la LLC es una enfermedad muy heterogénea con un amplio espectro de presentaciones clínicas, que van desde casos de progresión rápida, refractarios al tratamiento, hasta otros de curso indolente, estable, habiéndose incluso descrito casos de regresión espontánea (Kwok et al., 2020). Pero a diferencia de otros trastornos hematológicos, los criterios para su diagnóstico son sencillos y se han incorporado plenamente en la actividad clínica de la mano de grupos como International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL) (Hallek, et al. 2018). No sólo los criterios diagnósticos, también hay consenso en los criterios de inicio de tratamiento. Es indiscutible el papel del tratamiento como elemento disruptivo en la evolución clonal del cáncer (Landau et al., 2015).

Los pacientes con enfermedad asintomática en estadio inicial (Rai 0, Binet A) se propone la estrategia *watch and wait* (WW) con seguimiento periódico, y demorar el inicio de tratamiento a la

evidencia de evolución clínica o desarrollo de sintomatología que lo justifique (Baliakas et al., 2022; Mukkamalla et al., 2022). Son cuestiones clave que aportan homogeneidad a una enfermedad clínicamente heterogénea, y facilitan enormemente el estudio de la evolución clonal.

Numerosos estudios han tratado de aportar información predictiva y/o pronóstica para guiar las decisiones clínicas basadas en variables clínicas, biológicas, citogenéticas, y ahora con los avances tecnológicos de secuenciación masiva, también moleculares, por lo que son muchos los sistemas de estratificación pronóstica que se han propuesto en las últimas décadas (Wierda et al., 2007, Pflug et al., 2014, International LLC-IPI working group, 2016).

La relación entre el impacto pronóstico y/o predictivo de estas variables en la dinámica clonal de la LLC es poco conocida, probablemente debido a la complejidad de reunir una serie amplia de casos con tipificación de todas las variables descritas, y evaluarlas en una línea temporal suficiente que permita tanto documentar la evolución clonal como establecer relaciones estadísticamente significativas con variables que metodológicamente sean accesibles a la práctica clínica. Ese ha sido el propósito de esta tesis doctoral.

Como se ha mencionado el reclutamiento de los casos fue relativamente sencillo, en tanto en cuanto el Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario, tiene una amplia trayectoria en el estudio de los síndromes linfoproliferativos crónicos, y disponía de muestras históricas de LLC desde 1999. A pesar de los esfuerzos de recogida de datos clínicos, resultó imposible completar las variables clínicas biológicas en todos los casos (58% de los casos).

Las características demográficas de los pacientes de la serie son los descritos en la bibliografía, con la salvedad de que en la serie objeto de este estudio, los pacientes tienen una mediana de edad de 61 años al diagnóstico, ligeramente inferior a la descrita. Por el hecho de ser un hospital de referencia en la Comunidad Valenciana, recoge casos complejos, o más jóvenes procedentes de centros hospitalarios de menor complejidad. Además, el mayor acceso de la población sana a controles analíticos ha permitido realizar más diagnósticos incidentales de LLC que en décadas previas (Hallek, 2019).

La caracterización inmunogenética de la región variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGVH), tiene un papel determinante en el manejo adecuado de los pacientes con LLC y debe evaluarse antes del inicio de tratamiento tal y como subrayan las guías (Agathangelidis et al., 2021; Eichhorst B, et al. 2021; Chiorazzi & Stevenson, 2020; Jaramillo et al., 2020; Hallek M, et al. 2018). Es independiente del estado clínico de los pacientes y de otros marcadores (Sutton et al., 2017), y ha demostrado ser un biomarcador estable e invariable de la población de células B clonales durante el

trascuro de la LLC (Hengeveld et al. 2022). Esta exclusividad ha sido clave en la caracterización de la serie en estadios iniciales, y a la hora de explotar su potencial uso como biomarcador de seguimiento en la evaluación de la enfermedad medible residual (EMR).

Tradicionalmente, el estudio del estado mutacional de IGVH se realiza mediante secuenciación Sanger (Sseq), una técnica que proporciona de forma relativamente sencilla y asequible un resultado preciso y fiable en la gran mayoría de casos. A pesar de ser la metodología más estandarizada, tiene algunas limitaciones, pudiendo dar resultados difíciles de interpretar o incluso fallar (Davi et al., 2020). La disponibilidad de muestras históricas hizo posible la puesta a punto de la técnica y la determinación por Sseq del estado mutacional de IGVH de forma retrospectiva, incorporando esta variable al estudio de la evolución clonal en la totalidad de los casos de la serie.

Debido a que la tecnología Sseq ofrece un ajustado límite de detección, se desestima información valiosa sobre clones minoritarios que podrían cambiar la categorización pronóstica de los pacientes, así como ocultar subclonas que ayudarían a comprender mejor la posible relación clonal de esta enfermedad. En este contexto, la incorporación de la NGS para la determinación de IGVH resultó ser la más atractiva y confiable para subsanar las limitaciones de Sseq, y responder al objetivo primario de este proyecto: aportar conocimiento sobre la evolución clonal y subclonal de la LLC.

A día de hoy, las nuevas guías del European Research Initiative on CLL (ERIC) recientemente publicadas, citan la NGS-IGVH en sus recomendaciones (Agathangelidis et al., 2022; Davi et al., 2020) acotando su aplicabilidad a casos muy particulares y sólo para obtener información sobre la arquitectura clonal. Además, a la falta de protocolos NGS consensuados, se suma la compleja interpretación de los resultados obtenidos y la necesidad de herramientas bioinformáticas especializadas, lo que dificulta por el momento su estandarización.

Con este escenario, para este trabajo se optó por el desarrollo de un protocolo de preparación de librerías propio del locus IGH por NGS y la herramienta específica B-MyRepCLL, reconstruyendo el repertorio IGVH y caracterizando los reordenamientos mayoritarios en las muestras basales. La alta resolución de la NGS hizo posible la identificación de clonotipos independientes y no relacionados que emergían sobre un fondo policlonal y no resueltos con el método convencional. Además, demostró ser un método altamente robusto en la anotación de los genes VDJ y en el porcentaje de homología alcanzado, con un grado de concordancia del 100% y 99% respectivamente. Se consiguió superar algunas de las limitaciones analíticas de la Sseq, y ampliar el conocimiento acerca de la relevancia clínica y biológica de las IGVH en la LLC, al proporcionar información sobre la arquitectura subclonal e intratumoral de la enfermedad.

La solvencia de la metodología desarrollada, junto con la herramienta específica B-MyRepCLL ya de dominio público (<https://github.com/afuentri/B-MyRepCLL>) sin duda facilitará el proceso de estandarización, y su validación con otros kits de uso comercial más herméticos como LymphoTrack assay (Invivoscribe Inc., San Diego, CA, United States), y con ello su implementación en la práctica clínica. Todo esto permite afirmar que el cambio metodológico a la NGS para la determinación de IGVH en LLC, es ya una realidad.

Si bien el estudio de IGVH por Sseq está ya implementado en la práctica habitual, el conocimiento sobre el impacto clínico de otras alteraciones genéticas todavía es limitado. Tras una exhaustiva revisión bibliográfica, se decidió evaluar el estado mutacional de 11 genes potencialmente implicados en la LLC. A la hora de seleccionar la metodología de secuenciación NGS, se optó por un procedimiento de lectura corta y sistemas Illumina, dada la alta flexibilidad y escalabilidad de la técnica, y por su sensibilidad en la detección de variantes a baja proporción (Mamanova et al., 2010). Aunque las diferentes químicas de secuenciación NGS presentan sus ventajas y limitaciones (Pickrell et al., 2012), la estrategia de secuenciación NGS por amplicones planteada, ha garantizado una alta profundidad de secuenciación y la detección de variantes de forma precisa y uniforme en los paneles utilizados.

La alta calidad y profundidad de secuenciación lograda en la mayoría de los paneles a estudio por NGS en el momento previo al tratamiento, reveló gran cantidad de genes impulsores y la influencia de su heterogeneidad tanto clonal como subclonal en la LLC (Nadeu et al., 2016; Spencer et al., 2014). En nuestra serie, los genes mutados de mayor a menor frecuencia son *SF3B1*, *TP53*, *NOTCH1*, *ATM* y *XPO1* mientras que las mutaciones en *EGR2*, *FBXW7*, *BIRC3*, *MYD88*, *POT1* y *NFKBIE* seguían siendo eventos muy raros en la LLC no tratada (Landau et al., 2015; Tausch et al., 2020). Además, la frecuencia mutacional coincidió con las esperadas, siendo las alteraciones que afectan a la respuesta al daño en el ADN la más común, seguidas de las variantes en los genes implicados en el *splicing*, transcripción y transporte del ARN, y de la vía de señalización de NOTCH (González-Gascón-Y-Marín et al., 2021), lo que refuerza la solidez de la población estudiada.

Además, las mutaciones clonales fueron las más frecuentes, aunque la secuenciación identificó un reservorio significativo de mutaciones subclonales que afectaron a genes clave, *TP53*, *SF3B1* y *XPO1* (Nadeu et al., 2016, 2018). La concomitancia entre las variantes clonales y subclonales respaldó el patrón de evolución mutacional convergente en la cohorte, ya descrito previamente como factor común en la LLC (Ojha et al., 2015). Siendo las células cancerosas ecosistemas de clones en evolución, la presión ejercida por el tratamiento, puede conducir a la selección diferencial de sub/clones de forma que converjan en la desregulación de las mismas vías funcionales, al afectar al mismo (evolución convergente) o a distintos genes (evolución divergente), y/o a otras vías esenciales. Por ello, y según lo comentado

previamente, el tratamiento es un factor disruptivo muy importante en la evolución clonal, y es el motivo por el que en la serie, además de estudiar el escenario de mutaciones somáticas en muestras de pacientes vírgenes de tratamiento, se completó el estudio en las muestras posteriores a la administración de distintas líneas terapéuticas. Así, se analizaron todas las variantes con potencial patogenicidad, independientemente de su carga y el tipo de convergencia mutacional, y se tuvieron en cuenta para asentar las variables genéticas iniciales sobre las que definir el modelo de evolución clonal durante el seguimiento.

En lo que respecta a las mutaciones en *TP53*, las pautas de ERIC recomiendan su determinación previa a la elección terapéutica (Malcikova et al., 2018) por tener un impacto clínico demostrado al conferir resistencia al tratamiento estándar (Lazarian et al., 2022; Rossi et al., 2014). En estas guías, se recoge que el umbral clínicamente significativo es a partir de VAF>10%, si bien es evidente que, si el protocolo de NGS es suficientemente sensible, será capaz de detectar un rango de mutaciones subclonales que pasaría desapercibido con protocolos de menor profundidad de lectura. Los estudios a día de hoy no definen con exactitud la relevancia pronóstica de los subclones de *TP53* con un VAF<10% antes del tratamiento, entre otros motivos, por la diversidad de protocolos de secuenciación, la falta de estandarización y la baja reproducibilidad entre las diferentes plataformas de secuenciación en este rango de detección (Malcikova et al., 2018). Para aportar luz sobre esta cuestión, en este estudio se ha tratado de forma más pormenorizada la anotación de las variantes subclonales en el gen *TP53*, representadas hasta en el 50% de los casos con *TP53_{mut}*. Para ello, el abordaje de secuenciación de *TP53* por amplicones con OG-*TP53*, ha asegurado una cobertura y profundidad lo suficientemente alta para cubrir la fracción subclonal hasta VAF 1% en más del 93% de los pacientes.

En esta experiencia, ha sido posible constatar que a medida que aumenta la complejidad y heterogeneidad intrínseca de cada panel, se requería mayor exigencia en cuanto a los criterios mínimos de calidad.

Respecto a la secuenciación del gen *ATM* ha sido todo un desafío, por ser un gen constituido por más de 150.000 bases comprendidas en 66 exones, que puede albergar tanto mutaciones somáticas como germinales (Baghaei Vaji et al., 2021; Petrackova et al., 2022). En una primera aproximación efectivamente se objetivó que la calidad de secuenciación era subóptima en algunos amplicones, pero se optó por dar prioridad a la determinación del resto de paneles, y es por ello que sólo se alcanzaron resultados óptimos en el 56% de los casos. Ahora bien, a pesar de las dificultades técnicas expuestas, fue posible corroborar en la serie su impacto adverso e incluso insinuar su potencial papel como marcador de evolución clonal. Para optimizar el protocolo de secuenciación del panel OG-*ATM* e intentar completar el perfil mutacional en la cohorte a estudio, en una segunda aproximación, se

explorarán opciones metodológicas en otra plataforma de secuenciación de alta capacidad, como el sistema de secuenciación HiSeq® o NextSeq® (Illumina®, California).

Volviendo a la caracterización de las variables, las mutaciones en *TP53* (Zenz et al., 2010), U-LLC (Giudice & Foà, 2019), niveles elevados de B2-microglobulina, y un perfil genético complejo con más de 2 mutaciones genéticas asociadas (Hu et al., 2019), se distribuyeron en los grupos de riesgo alto/muy alto según LLC-IPI, y aportaron al seguimiento de los pacientes una corta TPT. El 50% de los casos que presentaron disrupción en *TP53*, presentaron mutación en ausencia de del17p (Campo et al., 2018). Estos resultados vienen a reforzar la inclusión del estudio del estado mutacional de *TP53* por NGS en el catálogo de prestaciones de biomarcadores moleculares de pruebas diagnósticas con fines asistenciales, para la orientación terapéutica o estimación del pronóstico durante la evolución de la enfermedad, de manera complementaria al estudio citogenético. El momento idóneo para hacer este estudio es cuando el paciente sea subsidiario de iniciar tratamiento (Malcikova et al., 2018).

A la vista de la gran cantidad de variables clínico-biológicas y genéticas caracterizadas, la edad, el estado mutacional U-LLC y la estereotipia del gen IGVH, fueron los predictores más relevantes de TPT. Estas variables fueron los impulsores más sólidos de la progresión y la enfermedad temprana de la LLC, lo que, trasladado a la práctica habitual, puede ayudar a optimizar los recursos en la práctica clínica. Si bien las mutaciones en otros genes, como *SF3B1*, *TP53*, *NOTCH1*, *ATM* y *XPO1* tuvieron contribuciones variables en la patogenia de la enfermedad, sobre todo en los pacientes de riesgo alto/muy alto, las asociaciones no fueron independientes ni significativas cuando se analizaron con otras características clínicas y mutacionales (Hu et al., 2019; Kleinstern et al., 2020; Mansouri et al., 2022). En concreto, el impacto pronóstico adverso de las alteraciones en la vía TP53, del(17p13)/*TP53*_{mut}, está ampliamente demostrado, lo que se traduce en TPT y SG inferior (Döhner et al., 2000, Zenz, Eichhorst, et al., 2010a). Si bien la falta de significación estadística pareció diluir el potencial de estos y otros clones en la LLC, el seguimiento permitió identificar y conocer los factores detonantes de la evolución clonal en esta enfermedad.

5.1 Evolución clonal, tratamiento y tiempo.

Ya se tenía conocimiento del papel que la remodelación del perfil genético molecular de la LLC tiene en la aparición o progresión de ciertas alteraciones genéticas, y de su impacto pronóstico, si bien su significado clínico es controvertido y muchas veces se circunscribe al tiempo en que aparece en el curso de la enfermedad y los tratamientos empleados. Se asume que todos los tratamientos de LLC, independientemente de la modalidad, crean algún tipo de cuello de botella evolutivo. Esto altera el

panorama sub/clonal a favor de aquellos con sensibilidad disminuida al tratamiento o mayor ventaja de supervivencia y crecimiento (Kwok & Wu, 2021).

La serie estudiada incluye pacientes diagnosticados antes del año 2000, cuando las guías clínicas IWCLL databan de 1996 (Cheson et al., 1996) y donde las opciones terapéuticas prácticamente se restringían al clorambucil, y también pacientes de diagnóstico más reciente que han podido beneficiarse de fármacos dirigidos a dianas moleculares. Así, superada la fase de los agentes alquilantes, la inmunquimioterapia (IQT) basada en Fludarabina, Ciclofosfamida y Rituximab (FCR), se estableció como la terapia de primera línea estándar para pacientes con LLC jóvenes sin comorbilidades (Fischer et al., 2016). Posteriormente, en la última década se ha asistido a la incorporación de terapias dirigidas en primera línea. Es el caso de fármacos como Ibrutinib, que constituye el tratamiento de elección para pacientes de alto riesgo, con alteraciones en *TP53* (Guías Españolas del Grupo Español de LLC, GELLC) (Barr et al., 2022).

Lógicamente la incorporación al arsenal terapéutico de agentes más eficaces se ha visto reflejado en mejoras en la SG y SLP de estos pacientes, identificando dos etapas marcadamente diferenciadas. Este escenario, junto con el hecho de incluir pacientes con un periodo de seguimiento dispar, desde solo unos pocos meses hasta 19 años, ha complicado el análisis del impacto de la evolución clonal de los clones y subclones identificados.

En la serie se ha constatado la eficacia de estas terapias, y también que el 65% de los casos tratados con IQT, y el 8% con Ibrutinib, recaen tras un periodo de respuesta inicial, habiendo observado distintos patrones evolutivos según el comportamiento de las variantes moleculares.

Un ejemplo ilustrativo y perfectamente documentado es el caso de las mutaciones en los genes *BTK* y *PLC γ 2* establecidos como mecanismo de resistencia, frecuentes en pacientes que progresan tras tratamiento con Ibrutinib (Bond & Woyach, 2019; Woyach et al., 2014, 2017).

Con motivo de este estudio, se ha desarrollado el panel IBR-R, de detección rápida y fácil, para la determinación de mutaciones de resistencia en los genes *BTK* y *PLC γ 2*. La optimización del panel permitió alcanzar valores en torno al 98% en términos de exactitud, precisión, repetibilidad y de reproducibilidad, y con una sensibilidad y especificidad analítica de hasta el 1%. Para la resolución de variantes a menor proporción fue necesario aumentar la cobertura mínima por región, y evitar así el error acumulado. Estas cualidades junto a la sencillez del protocolo han hecho posible su incorporación a la práctica clínica habitual del Servicio de Hematología del Hospital Clínico de Valencia.

Con objeto de conseguir una mejor calidad y mayor profundidad de secuenciación en los paneles TP53, OG-CLL, OG-CLL2 e IBR-R con respecto al análisis pretratamiento, las mutaciones somáticas presentes en estadios iniciales se analizaron en las muestras secuenciales. Se atendió a los cambios en la frecuencia alélica y a la fracción de células cancerosas (CCF) representada, en la cohorte de pacientes tratados con IQT entre 2003 y 2019, y los que recibieron Ibrutinib en monoterapia entre 2016 y 2019.

En consonancia con lo publicado, (Rossi et al., 2009; Schuh et al., 2012), se constató en la serie que ciertos impulsores citogenéticos, como la trisomía 12 y la del(13q14), permanecían estables a lo largo del seguimiento de los pacientes tratados con IQT. Es más, la mayor tasa de evolución clonal observada se dio por la adquisición de mutaciones *de novo* en la población, lo que sugirió que quizás la IQT en sí misma había acelerado el proceso evolutivo en la cohorte tratada con IQT (Chigrinova et al., 2013; Fabbri et al., 2013). Esto fue así, dado que, a pesar de que sólo el 3% de los pacientes presentaron aberraciones basales en TP53 [$TP53_{mut}$ y/o del(17p13)], las mutaciones secuencialmente adquiridas en los genes *TP53* y *SF3B1*, y la del(17p13), revelaron el patrón de evolución más relacionado con el mecanismo de resistencia molecular a la IQT (Rossi et al., 2011; Landau & Wu, 2013). Tal y como está descrito, la resistencia a la IQT emplea diversas estrategias evolutivas, a menudo al seleccionar clones $TP53_{mut}$ preexistentes que albergan una alta complejidad genómica y dan como resultado una marcada evolución clonal en la recaída (González-Rincón et al., 2021; Zapatka et al., 2022). Con los datos obtenidos, se pudo demostrar que este proceso también ocurre en pacientes con LLC sin aberraciones en *TP53* antes del tratamiento (Zapatka et al., 2022), de ahí la importancia de determinar el estado mutacional de $TP53_{mut}$ y/o del(17p13) también tras la recaída (Hallek et al., 2018).

Estudios recientes que tratan de relacionar la presencia de mutaciones somáticas con el pronóstico o la evolución de la enfermedad, aportan una dimensión adicional al vincular la heterogeneidad clonal y el aumento de la fracción de células cancerosas con un mayor riesgo de progresión tras IQT (Landau & Wu, 2013; Nadeu et al., 2016). Desafortunadamente, aunque en este estudio se tuvieron en cuenta todas las mutaciones VAF<10%, no se apreciaron diferencias significativas entre mutaciones clonales y subclonales.

Sin duda, será necesario cuantificar el impacto de las mutaciones subclonales que puedan favorecer el desarrollo de una forma de LLC más activa en una cohorte de pacientes más amplia, y explorar métodos de secuenciación de alta sensibilidad que cuestionen el límite de detección por debajo del VAF 1%. Actualmente, el análisis mutacional basado en UMI (*Unique Molecular Identifier*) permite marcar cada fragmento original de ADN e identificar y eliminar durante el análisis, los duplicados de PCR generados en la preparación de las librerías. De esta forma, se reducen los errores de secuenciación y

los artefactos en el flujo de trabajo de NGS, desenmascarando las variantes genómicas de baja detección a alta precisión (Singh, 2020). La WGS (*Whole Genome Sequencing*, Secuenciación del genoma completo) basado en NGS-UMIS de alta cobertura ha permitido a Nadeu F y colaboradores, detectar subclones de aparición muy temprana, que impulsan las últimas etapas de la evolución de la LLC a la transformación a síndrome de Richter (Nadeu et al., 2022).

Los resultados obtenidos en este estudio respaldan la presencia de cambios clonales marcados dentro del periodo temprano del tratamiento con Ibrutinib, seguido por una posterior estabilización (Figura 4.15). Si bien la fluctuación clonal fue similar en toda la cohorte, ningún factor común de LLC exhibió una tendencia clara de expansión clonal que sugiriera una aptitud selectiva a Ibrutinib a corto plazo. A diferencia de los patrones observados con la IQT, los sub/clones *TP53*_{mut} tenían una probabilidad similar de estabilizarse o disminuir con el tratamiento durante el primer año, mientras que el aumento de carga se asoció a clones con mutaciones descritas en otros genes *driver*, como *SF3B1* y *NOTCH1*, lo que pone de manifiesto la relación indirecta entre *TP53*_{mut} y la competencia clonal en el contexto de la terapia con Ibrutinib (Cafforio et al., 2022; Landau et al., 2017).

Tradicionalmente con los esquemas de IQT convencional, asistimos a la disminución paulatina de la carga tumoral, sin embargo, con la administración de los inhibidores de BCR en la LLC, se produce linfocitosis inducida por el tratamiento atribuida a la salida de las células tumorales de sus correspondientes nichos (fundamentalmente los ganglios linfáticos) (Hallek, 2019). De hecho en esta serie, se constató un aumento del recuento linfocitario absoluto (RLA) a los tres meses de tratamiento, con una citorreducción posterior tal y como se refiere en la bibliografía (Barrientos et al., 2019; Brown et al., 2018; Herman et al., 2014). De forma paralela, se comprobó un cambio en la CCF seguido de una disminución en la carga tumoral total, que fluctuó acorde con el RLA, y que sugiere que la dinámica clonal de los pacientes tratados con Ibrutinib, se asemeja a la población linfocitaria cuantificada en el hemograma.

Existen evidencias que avalan que esta terapia ejerce además una fuerte presión selectiva a largo plazo al promover el eventual desarrollo de sub/clones resistentes (Ferrando & López-Otín, 2017; Kwok & Wu, 2021). La revisión realizada por Sedlarikova y colaboradores, recoge que las mutaciones asociadas a la resistencia a Ibrutinib, tienden a ocurrir entre el segundo y el cuarto año de tratamiento, y que pueden detectarse varios meses antes de la recaída clínica, incluso 10.5 meses antes tal y como apunta Gangó et al, con el uso de la tecnología PCR digital (*Digital Droplet PCR*, ddPCR) (Gángó et al., 2020; Sedlarikova et al., 2020).

En nuestra serie, al representar mejor el escenario genético de la posible LLC recidivante después del tratamiento con Ibrutinib con la implementación del panel IBR-R, se detectó la mutación en el gen *BTK* p.Cys481Ser, reforzando el papel de las mutaciones en este gen como elementos centrales de la resistencia a Ibrutinib. En concreto, el paciente LLC-91 mostró la mutación p.Cys481Ser 6 meses antes de cualquier evidencia clínica de enfermedad recidivante. Al tratarse de una mutación *hotspot*, el estudio combinado con PCR digital (digital PCR) (Galimberti et al., 2022), podría ser un *tándem* interesante con el que poder profundizar en el estudio del componente subclonal de la LLC, por ser una técnica con mayor precisión, sensibilidad y especificidad para analizar alteraciones conocidas. Sin embargo, la validación de estas variantes como verdaderas positivas, requiere enfoques adicionales, continúa en el ámbito experimental y se desconoce por el momento su repercusión clínica. Todavía hoy estas mutaciones asociadas a resistencia no tienen solvencia suficiente como para atribuirles el rol de indicadores de interrupción terapéutica, a menos que se acompañe de signos o síntomas de progresión clínica.

En lo que se refiere al análisis de supervivencia según el esquema terapéutico en primera línea de tratamiento, la tendencia observada a los 5 años, fue similar a la mostrada en el estudio RESONATE-2 tras 8 años de seguimiento, con una mediana de SLP no alcanzada en los pacientes del brazo de Ibrutinib, y la mayoría de los pacientes permanecieron libres de progresión. Al igual que los datos de RESONATE-2 a largo plazo, se ha demostrado un beneficio sostenido con Ibrutinib en tratamiento de primera línea en LLC, incluso en pacientes con características genómicas de alto riesgo, como aberraciones en *TP53*, del(11q22) y/o U-LLC (Barr et al., 2022). Ahora bien, a expensas de su administración indefinida hasta la progresión de la enfermedad o la intolerancia al fármaco puesto que la tasa de respuestas completas del tratamiento en monoterapia fue muy baja (5%).

Estos resultados vienen a confirmar una vez más el efecto disruptivo del tratamiento en la evolución clonal. Determinar qué alteraciones genéticas son las verdaderamente claves en la tumorigénesis y cómo evolucionan a lo largo de la enfermedad y la terapia son todavía cuestiones pendientes en la biología del cáncer. Siguiendo los principios darwinianos, *“Una ley general, que conduce al progreso de todos los seres orgánicos, a saber, multiplicarse, variarse, que vivan los más fuertes y mueran los más débiles”*, el perfil clonal de la LLC se enfrenta a presiones selectivas en constante cambio impulsadas por el tratamiento. Landau y colaboradores, compararon muestras emparejadas pretratamiento/recaída de 59 pacientes, y observaron que la evolución y selección clonal se trata de *“la regla, no la excepción”* (Landau et al., 2015), aunque con un perfil mutacional diferencial según la estrategia terapéutica.

Si bien, la presión del tratamiento es importante en la evolución clonal, de ningún modo es la única variable implicada. A este respecto, Gruber y colaboradores, demostraron que en la fase entre el diagnóstico y la progresión que justifica el inicio de tratamiento, muchos pacientes con LLC pueden exhibir distintos patrones de crecimiento, asociados conjuntamente a ciertos perfiles genéticos y características clínicas diferenciales. Durante la dinámica de crecimiento indolente de 107 pacientes con LLC, demostraron patrones de expansión linfocitaria exponenciales, de crecimiento intermedio, y logístico, asociados a su vez, con marcadas diferencias en la composición genética, el ritmo de progresión de la enfermedad y el grado de evolución clonal (Gruber et al., 2019). Aunque la falta de disponibilidad de muestra al diagnóstico, limitó su trazabilidad en esta cohorte, el empleo de herramientas como la evaluación de cambios en la CCF abre un camino para anticipar la expansión clonal desde el diagnóstico hasta la progresión de la LLC.

De hecho, en nuestra serie, los resultados obtenidos permiten comprobar la fluctuación a la que se someten las variables genéticas ante la presión ejercida por el tratamiento, y los perfiles mutacionales más estrechamente relacionados con la recaída. Extrapolar los conocimientos genéticos aquí reflejados, en cohortes más extensas de pacientes al diagnóstico, integrarlos con datos epigenéticos y asociar la coevolución tumoral con el microambiente inmunitario a partir de muestras de distinta naturaleza (ganglios linfáticos y médula ósea), sin duda es la vía para profundizar en el conocimiento de la evolución en la LLC y con ello ser capaces de anticipar la evolución clínica de los pacientes.

Los modelos neodarwinianos de evolución tumoral generalmente asumen que las mutaciones se adquieren secuencialmente de manera gradual a lo largo del tiempo. Sin embargo, varias líneas de evidencia sugieren que, en algunos casos, las aberraciones genómicas pueden ocurrir simultáneamente en las células cancerosas, respaldando un modelo en el que los tumores crecen de forma no lineal pero sí ramificada, con múltiples subclones derivados de un ancestro común que finalmente divergen y se expanden a la vez con diferentes aptitudes (Greaves y Maley, 2012; Swanton, 2012). Anderson et al. fueron los primeros en mostrar trayectorias evolutivas ramificadas en la Leucemia Linfoblástica Aguda (Anderson et al, 2011).

Junto con el descubrimiento de nuevas mutaciones impulsoras, la NGS ha revelado un grado inmenso de heterogeneidad intratumoral e intertumoral y ha permitido describir una marcada evolución clonal a largo plazo en la serie a estudio. El seguimiento de las mutaciones somáticas y sus cambios en la frecuencia alélica a lo largo del tiempo y la evaluación de la fracción de células cancerosas subyacentes en nuestra serie, ha revelado también esos patrones evolutivos no darwinianos, muy distintos y cada vez más evidentes, según se ampliaba la franja temporal de seguimiento (Baghaei Vaji

et al., 2021; Petrackova et al., 2022). Al igual que lo observado en estudios de WGS, se ha demostrado que la evolución de la LLC durante la terapia sigue uno de varios patrones (evolución estable, lineal o ramificada), siendo la evolución ramificada la más común en nuestro caso (Herling et al., 2018; Nadeu et al., 2018).

Durante el curso clínico de seis pacientes no tratados a largo plazo (5 años) y sin mutaciones genéticas asociadas en la muestra basal, ocurrieron cambios sustanciales en la composición clonal sólo después del tratamiento con IQT, desde la evolución de uno o pocos subclones, hasta la adquisición simultánea de otros, indicativos de evolución ramificada. Por lo que en ausencia de indicaciones claras de tratamiento para evitar acelerar la evolución clonal y la selección de subclones más agresivos, se respalda el enfoque *watch and wait* (WW) (Condoluci & Rossi, 2020; Fabbri et al., 2013).

Esta apreciación se hizo más evidente a medida que se acumularon distintas líneas terapéuticas, principalmente IQT, traduciéndose en una mayor presión selectiva sobre el componente celular y el consecuente cambio secuencial de la arquitectura clonal y subclonal de la enfermedad. Aunque en términos clínicos, la respuesta a Ibrutinib parece ser independiente a la presencia de aberraciones en *TP53*, los hallazgos expuestos, subrayan la gran capacidad evolutiva y la sensibilidad diferencial de las diversas mutaciones de *TP53* a Ibrutinib. El análisis de la arquitectura sub/clonal identificó un patrón en la dinámica clonal de mutaciones *BTK* y *TP53*, diferente del patrón alternativo previamente descrito (Gángó et al., 2020). Los clones del(17p13)/*TP53* se expandieron con CCF en aumento, permanecieron estables o incluso disminuyeron en el estudio temporal, mientras que los clones *BTK* siempre se expandieron. A los 3 años de seguimiento, la progresión molecular de la enfermedad potenciada por la adquisición de *BTK_{mut}* fue creciente, y se detectó de manera temprana y sensible, precediendo tanto la sospecha como la recaída clínica (Sedlarikova et al., 2020). Es por ello, por lo que a pesar de que la asociación de la recaída con la aparición de la resistencia en *BTK_{mut}* fue significativa, y potencialmente con la adquisición de mutaciones en *TP53*, la detección de *BTK_{mut}* no pudo correlacionarse con SLP y SG en la cohorte estudiada. Aún así, los pacientes tratados con Ibrutinib, se exponen a un tratamiento continuado, lo que potencia una mayor selección clonal y progresión de la enfermedad; por lo tanto, manejar la resistencia e identificar qué pacientes están en riesgo de recaída es de suma importancia. Hay todavía un largo camino por recorrer para optimizar el manejo de una enfermedad resistente que será cada vez menos evidente con la era de la IQT, pero cada vez más en la del tratamiento con nuevos agentes dirigidos.

En este trabajo hemos podido constatar que evaluar la fracción alélica secuencial de cada mutación constituye un buen indicador para evaluar la capacidad evolutiva de la enfermedad, ya que fundamenta la posible asociación entre una dinámica clonal temprana y una respuesta adversa.

5.2 Enfermedad medible residual en la LLC: algunas respuestas, muchas preguntas.

La enfermedad medible residual (EMR) es un indicador muy sensible de la carga de la enfermedad durante y al final del tratamiento, y constituye una herramienta esencial en la valoración de la respuesta (Wierda et al., 2021) en tanto en cuanto se considera que la existencia de una población de células tolerantes que no son detectadas con la metodología convencional son las responsables de la recaída de la enfermedad tras la respuesta completa. En hematología, la información proporcionada por los estudios de EMR en algunas hemopatías agudas como es el caso de la leucemia linfoblástica aguda, constituye un factor pronóstico independiente, y añade valor a otros parámetros clínico-biológicos. También en hemopatías crónicas como en la leucemia mieloide crónica. De hecho, tiene un peso crucial en el ámbito de estudios clínicos controlados, para la toma de decisiones terapéuticas, incluso para el diseño de los nuevos protocolos terapéuticos de hemopatías malignas.

La citometría de flujo (CF) ha demostrado ser uno de los métodos más precisos para evaluar la respuesta a la terapia, pero lo cierto es que independientemente de cuán minuciosamente se confirme la remisión, una proporción no despreciable de pacientes finalmente recaen (Moreno & Mora, 2021).

Por otra parte, el valor predictivo de EMR depende directamente de la modalidad del tratamiento. Como se ha mencionado los inhibidores de BTK a menudo proporcionan una supervivencia prolongada sin lograr una EMR negativa, sin que se aprecie correlación con variables clínico-biológicas basales, así como a la CCF observada en la última muestra de seguimiento (Rawstron et al., 2016; Al-Sawaf et al., 2022). Por tanto, valorar la EMR en casos en los que no se alcanza respuesta completa clínica es cuestionable, como en el caso de los pacientes tratados con Ibrutinib, aunque sí está justificado en el grupo de pacientes tratados con esquemas de IQT. Por esta razón, se ha investigado el subgrupo de pacientes tratados con IQT, la correlación de la EMR por CF con los cambios clonales detectados en la evolución de la LLC en este proyecto (Fürstenau et al., 2019).

Acorde a lo descrito en la bibliografía, en la serie la EMR negativa demostró ser un favor predictivo independiente de SLP y SG en pacientes con LLC tratados con IQT, asociada a CCF indetectables durante el transcurso de la enfermedad, mientras que una gran proporción de los pacientes con EMR+ desarrollaron una evolución clonal CCF adquirida o aumentada (González-Rincón et al., 2021; Hallek et al., 2010).

Vistas las limitaciones de la CF como herramienta de EMR en la LLC, se decidió abordar el papel de la NGS en el seguimiento clonal de la enfermedad en pacientes tratados con IQT, ya que con Ibrutinib, los cambios CCF son menos predecibles.

En primer lugar, se compararon los resultados relativos de la citometría de flujo (CF) con los ofrecidos por el ensayo IGVH por NGS, en la evaluación de la EMR. Con tal de evaluar el límite de cuantificación del ensayo IGVH por NGS, se seleccionaron un subgrupo de pacientes tratados con IQT, sobre los que se demostró una excelente concordancia, sensibilidad y linealidad con la CF usando el umbral de 0.010% (EMR 10^{-4}). De esta forma, se consiguió un primer paso en la validación del método sobre el que seguir trabajando para evaluar niveles de detección inferiores, entre 0.0010-0.00010% (EMR 10^{-5} – 10^{-6}). La combinación de ambas tecnologías, permitiría un enfoque altamente sensible en la detección de EMR, al tiempo que la NGS proporciona un método reproducible y ampliamente accesible para cuantificar la EMR y optimizar el tratamiento en LLC (Hallek et al., 2018; Al-Sawaf et al., 2021).

En segundo lugar, la detección del clonotipo IGVH por NGS, como la CF también ofrece resultados en términos cuantitativos al estimar el tamaño del clonotipo en función del número de lecturas obtenido durante la secuenciación (Langerak et al., 2017). Pero resulta necesario extrapolar el resultado al tamaño del clon celular, ya que la mayoría de los métodos que se utilizan para su determinación distorsionan la representación del clon real al basarse en PCR, aunque se garantice una cantidad de ADN de partida suficiente (Davi et al., 2020). Determinar la proporción de células LLC hipotéticas en base al recuento linfocitario de cada paciente, y su validación con el inmunofenotipo obtenido por CF, resultó ser una aproximación metodológica no descrita en la literatura. Esta estrategia ha hecho posible utilizar el método de preparación de librerías *in house* del locus IGH por NGS y la herramienta específica B-MyRepCLL, para el seguimiento y cuantificación del clonotípico en LLC.

Como resultado no se detectaron cambios en el clon principal en el momento del diagnóstico, seguimiento y recaída. De hecho, el clonotipo inicial fue persistente en la mayoría de los pacientes tratados con TD y se correlacionó el tipo de respuesta al tratamiento y la detección del clonotipo en el 100% de los casos tratados con IQT. Los clones en la recaída tenían exactamente los mismos reordenamientos VDJ e hipermutaciones de IGVH, sugiriendo que el clon leucémico original pudo escapar de la toxicidad del tratamiento por la adquisición de nuevas mutaciones recurrentes o protegido en nichos microambientales (Stamatopoulos et al., 2017).

En cambio, el comportamiento de los reordenamientos no productivos sí mostró diferencias en función de la terapia, con una persistencia única del clon no productivo a IQT. Los nuevos datos revelados por F. Nadeu y colaboradores, destacan la importancia de la expansión de subclones improductivos, *a priori* con menor potencial patológico, en el momento de transformación a Síndrome de Richter, sugiriendo que los subclones pueden tener una ventaja proliferativa bajo terapia incluso ante inhibidores de BCR (Nadeu et al., 2022).

Conclusiones

6 Conclusiones

Con lo expuesto, las conclusiones de mi tesis doctoral son:

- La uniformidad en las características clínico biológicas y citogenéticas descritas en la serie, refuerza la LLC como el modelo ideal para el estudio de la selección y evolución clonal.
- El protocolo desarrollado de preparación de librerías *in house* del locus IGH por NGS y la herramienta específica B-MyRepCLL, demostró ser altamente robusto en la anotación de los reordenamientos VDJ y en la detección del repertorio inmunogenético, con un grado de concordancia del 100% y 99% respectivamente con respecto a la Sseq, considerada el *gold-estándar*.
- Este estudio pone de relieve la importancia de una caracterización genética extensa, en el estadio inicial de la enfermedad por la técnica de NGS. A pesar de que sólo el estudio de *TP53* y de IGHV se ha implementado en la práctica clínica de la LLC de forma generalizada, el perfil genético mutacional de los pacientes con LLC queda descrito por alteraciones genéticas que afectan principalmente a *NOTCH1*, *SF3B1*, *ATM* y *XPO1*.
- Conocer el patrón genético intrapaciente, permite evaluar la fracción alélica secuencial de cada mutación como indicador de la capacidad evolutiva de la enfermedad, sirviendo de fundamento de una potencial asociación entre una dinámica clonal temprana y una respuesta adversa a según el tipo de tratamiento administrado.
- El tratamiento ejerce presión selectiva sobre las variables genéticas y moleculares y es inductor de evolución subclonal y clonal en la LLC. Apreciamos una evolución clonal diferencial: la adquisición secuencial de mutaciones *de novo* en los genes *TP53* y *SF3B1*, y la del(17p13), revelan el patrón de evolución clonal más relacionado con el mecanismo de resistencia molecular a la IQT, mientras que existe una relación indirecta entre *TP53_{mut}* y la competencia clonal en el contexto de la terapia con Ibrutinib.
- El panel IBR-R permite detectar mutaciones de resistencia asociadas al gen *BTK* y *PLCγ2* y aporta a la práctica clínica. El hecho de identificar la mutación asociada a la resistencia en el gen *BTK*, p.Cys481Ser, 6 meses antes de cualquier evidencia clínica de enfermedad recidivante pone de manifiesto su valor como biomarcador predictivo de futuras recaídas o progresión de la enfermedad.
- La implementación inmunogenética por NGS permite evaluar el repertorio de células B, y la dinámica y evolución clonotípica incluso en los casos sin alteraciones descritas en los genes *driver*. Además, evalúa la enfermedad medible residual con una excelente concordancia, sensibilidad y linealidad en el umbral de 0.010% (EMR 10^{-4}) con respecto a la citometría de flujo.

- Los modelos evolutivos descritos en la LLC son lineal y ramificado, siendo este último el más representado, y dependientes del tiempo de seguimiento y de las modalidades terapéuticas.

Proyección científica

7 Proyección científica

Comunicaciones a congresos:

Parte de los resultados de este trabajo fueron aceptados para su comunicación oral en el congreso de la Asociación Valenciana de Hematología y Hemoterapia, Valencia (AVHH) celebrado en Valencia en el año 2021.

Parte de los resultados de este trabajo fueron aceptados para su comunicación en formato de póster en:

- LXIV congreso nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), celebrado en Barcelona en el año 2022.
- Congreso de la Asociación Valenciana de Hematología y Hemoterapia, Valencia (AVHH) celebrado en Valencia en el año 2021.
- *63rd American Society Hematology Annual Meeting*, celebrado en Atlanta en el año 2021.
- 25rd Congress of The European Hematology Association (EHA), edición virtual en el año 2020.
- *61rd American Society Hematology Annual Meeting*, celebrado en Orlando en el año 2019.
- LXI Congreso Nacional SEHH-XXXV Congreso Nacional SETH celebrado en Valencia en el año 2019.
- XVIII International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia, celebrado en Edimburgo en el año 2019.
- LX Congreso Nacional SEHH-XXXIV Congreso Nacional celebrado en Granada en el año 2018.
- 23rd Congress of The European Hematology Association (EHA), celebrado en Estocolmo en el año 2018.
- *59th American Society Hematology Annual Meeting*, celebrado en Atlanta en el año 2017.
- LIX Congreso Nacional SEHH-XXXIII Congreso Nacional SETH 2017, celebrado en Málaga en el año 2017.
- *XVII International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*, celebrado en San Diego en el año 2017.
- *58th American Society Hematology Annual Meeting*, celebrado en San Diego en el año 2016.
- LVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), celebrado en Santiago de Compostela en el año 2016.

Formación y educación:

- Coordinación de la 1ª y 2ª Edición Curso teórico-práctico de Leucemia Linfática Crónica Nacional, organizado por Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) y Grupo Español de Leucemia Linfocítica Crónica (GELLC), año 2021-2022, y 2022-2023 (acreditación por

la Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias del Sistema Nacional de Salud).

- Coordinación de la 1ª, 2ª y 3ª Edición Curso teórico-práctico de Leucemia Linfática Crónica Comunidad Valenciana, organizado por INCLIVA, año 2020-2021, 2021-2022, y 2022-2023 (acreditación por Escola Valenciana d'Estudis de la Salut, EVES).

Artículos científicos:

- Francesc Bosch; Blanca Navarro Cubells; Marta Crespo; Miguel Alcoceba; Julio Bravo Sánchez; Bárbara Tazón; Alicia Serrano Alcalá; Marta García Álvarez; Lydia González Serrano; Pablo Alonso Torres; Miguel Villanueva; Cristina Loriente; Pau Abrisqueta; Manel Peiró; Jose Antonio García Marco; Marcos González; María José Terol Casterá. Building a network of TP53 and IGHV testing reference centers across Spain: the Red53 initiative. 10.1007/s00277-020-0, Annals Hematology, 06/01/2021.
- Ángeles Medina; Marta Crespo; Blanca Espinet; Miguel Alcoceba; Ana Muntanyola; Alicia Serrano Alcalá; José Antonio García Marco; Pau Abrisqueta; Julio Delgado; Marcos González; María José Terol Castera; Lucrecia Yáñez; Rafael Andreu; Javier de la Serna; Javier Loscertales; José Ángel Hernández; Ángel Ramírez; Francesc Bosch. GUÍA NACIONAL DE LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA Y LINFOMA LINFOCÍTICO. GELLC, 04/04/2020.

Estancias en el extranjero:

Estancia de tres meses en el grupo de investigación en LLC del Dr. Kostas Stamatopoulos, MD, PhD, en el *Institute of Applied Biosciences at CERTH, the Center for Research and Technology Hellas*, Tesalónica, Grecia, desde Septiembre hasta Diciembre 2018.

Bibliografía

8 Bibliografía

- Agathangelidis, A., Darzentas, N., Hadzidimitriou, A., Brochet, X., Murray, F., Yan, X.-J., Davis, Z., van Gastel-Mol, E. J., Tresoldi, C., Chu, C. C., Cahill, N., Giudicelli, V., Tichy, B., Pedersen, L. B., Foroni, L., Bonello, L., Janus, A., Smedby, K., Anagnostopoulos, A., Stamatopoulos, K. (2012). Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*, *119*(19), 4467–4475.
- Agathangelidis, A., Psomopoulos, F., & Stamatopoulos, K. (2019). Stereotyped B Cell Receptor Immunoglobulins in B Cell Lymphomas. *Methods in Molecular Biology*, *1956*, 139–155.
- Agathangelidis, A., Chatzidimitriou, A., Gemenetzi, K., Giudicelli, V., Karypidou, M., Plevova, K., Davis, Z., Yan, X.-J., Jeromin, S., Schneider, C., Pedersen, L. B., Tschumper, R. C., Sutton, L.-A., Baliakas, P., Scarfò, L., van Gastel, E. J., Armand, M., Tausch, E., Biderman, B., Stamatopoulos, K. (2021). Higher-order connections between stereotyped subsets: implications for improved patient classification in CLL. *Blood*, *137*(10), 1365–1376.
- Agathangelidis, A., Chatzidimitriou, A., Chatzikonstantinou, T., Tresoldi, C., Davis, Z., Giudicelli, V., Kossida, S., Belessi, C., Rosenquist, R., Ghia, P., Langerak, A. W., Davi, F., Stamatopoulos, K., & ERIC, the European Research Initiative on CLL. (2022). Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: the 2022 update of the recommendations by ERIC, the European Research Initiative on CLL. *Leukemia*, *36*(8), 1961–1968.
- Ahn, I. E., Farooqui, M. Z. H., Tian, X., Valdez, J., Sun, C., Soto, S., Lotter, J., Housel, S., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C. M., Maric, I., Calvo, K. R., Nierman, P., Hughes, T. E., Saba, N. S., Marti, G. E., Pittaluga, S., Herman, S. E. M., Niemann, C. U., Wiestner, A. (2018). Depth and durability of response to ibrutinib in CLL: 5-year follow-up of a phase 2 study. *Blood*, *131*(21), 2357–2366.
- Ahn, I. E., Tian, X., Ipe, D., Cheng, M., Albitar, M., Tsao, L. C., Zhang, L., Ma, W., Herman, S. E. M., Gaglione, E. M., Soto, S., Dean, J. P., & Wiestner, A. (2021). Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With Ibrutinib: Development and Validation of a Four-Factor Prognostic Model. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *39*(6), 576–585.
- Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Araujo, I. B. de O., Berti, E., Bhagat, G., Borges, A. M., Boyer, D., Calaminici, M., Chadburn, A., Chan, J. K. C., Cheuk, W., Chng, W.-J., Choi, J. K., Chuang, S.-S., Coupland, S. E., Czader, M., Dave, S. S., Xiao, W. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, *36*(7), 1720–1748.
- Alamyar, E., Duroux, P., Lefranc, M.-P., & Giudicelli, V. (2012). IMGT(®) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods in Molecular Biology*, *882*, 569–604.
- Albi, E., Capasso, A., Schiattone, L., Ghia, P., & Scarfò, L. (2022). Are we finally getting personal? Moving towards a personalized approach in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Cancer Biology*, *84*, 329–338.

- Almasri, M., Amer, M., Ghanej, J., Mahmoud, A. M., Gaidano, G., & Moia, R. (2022). Druggable Molecular Pathways in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Life*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/life12020283>
- Al-Sawaf, O., Zhang, C., Tandon, M., Sinha, A., Fink, A.-M., Robrecht, S., Samoylova, O., Liberati, A. M., Pinilla-Ibarz, J., Opat, S., Sivcheva, L., Le Dû, K., Fogliatto, L. M., Niemann, C. U., Weinkove, R., Robinson, S., Kipps, T. J., Tausch, E., Schary, W., Fischer, K. (2020). Venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab for previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (CLL14): follow-up results from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, *21*(9), 1188–1200.
- Al-Sawaf, O., Seymour, J. F., Kater, A. P., & Fischer, K. (2021). Should Undetectable Minimal Residual Disease Be the Goal of Chronic Lymphocytic Leukemia Therapy? *Hematology/oncology Clinics of North America*, *35*(4), 775–791.
- Al-Sawaf, O., Hallek, M., & Fischer, K. (2022). The role of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O*, *20*(2), 97–103.
- Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., & Vakhlu, J. (2016). High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian Journal of Microbiology*, *56*(4), 394–404.
- Austen, B., Powell, J. E., Alvi, A., Edwards, I., Hooper, L., Starczynski, J., Taylor, A. M. R., Fegan, C., Moss, P., & Stankovic, T. (2005). 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*, *106*(9), 3175–3182.
- Baghaei Vaji, F., Boroumand Nasr, A., Rezvani, A., Ayatollahi, H., Goudarzi, S., Lavasani, S., & Bagheri, R. (2021). Prognostic significance of ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia: A meta-analysis. *Leukemia Research*, *111*, 106729.
- Baliakas, P., Hadzidimitriou, A., Sutton, L.-A., Rossi, D., Minga, E., Villamor, N., Larrayoz, M., Kminkova, J., Agathangelidis, A., Davis, Z., Tausch, E., Stalika, E., Kantorova, B., Mansouri, L., Scarfò, L., Cortese, D., Navrkalova, V., Rose-Zerilli, M. J. J., Smedby, K. E., European Research Initiative on CLL (ERIC). (2015). Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *29*(2), 329–336.
- Baliakas, P., Moysiadis, T., Hadzidimitriou, A., Xochelli, A., Jeromin, S., Agathangelidis, A., Mattsson, M., Sutton, L.-A., Minga, E., Scarfò, L., Rossi, D., Davis, Z., Villamor, N., Parker, H., Kotaskova, J., Stalika, E., Plevova, K., Mansouri, L., Cortese, D., European Research Initiative on CLL (ERIC). (2019). Tailored approaches grounded on immunogenetic features for refined prognostication in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, *104*(2), 360–369.
- Baliakas, P., Espinet, B., Mellink, C., Jarosova, M., Athanasiadou, A., Ghia, P., Kater, A. P., Oscier, D., Haferlach, C., & Stamatopoulos, K. (2022). Cytogenetics in Chronic Lymphocytic Leukemia: ERIC Perspectives and Recommendations. *HemaSphere*, *6*(4), e707.
- Barrientos, J. C., Burger, J. A., Byrd, J. C., Hillmen, P., Zhou, C., Ninomoto, J., James, D. F., & Kipps, T. J. (2019). Characterizing the kinetics of lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with single-agent ibrutinib. *Leukemia & Lymphoma*, *60*(4), 1000–1005.
- Barr, P. M., Owen, C., Robak, T., Tedeschi, A., Bairey, O., Burger, J. A., Hillmen, P., Coutre, S. E., Dearden, C., Grosicki, S., McCarthy, H., Li, J.-Y., Offner, F., Moreno, C., Zhou, C., Hsu, E., Szoke, A., Kipps, T. J., & Ghia, P. (2022). Up to 8-year follow-up from RESONATE-2: first-line ibrutinib treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood Advances*, *6*(11), 3440–3450.

- Binet, J. L., 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, M. T., Monconduit, M., Belabbès, S., & Gremy, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, *48*(1), 198–206.
- Bispo, J. A. B., Pinheiro, P. S., & Kobetz, E. K. (2020). Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *10*(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034819>
- Bittolo, T., Pozzo, F., Bomben, R., D'Agaro, T., Bravin, V., Bulian, P., Rossi, F. M., Zucchetto, A., Degan, M., Macor, P., D'Arena, G., Chiarenza, A., Zaja, F., Pozzato, G., Di Raimondo, F., Rossi, D., Gaidano, G., Del Poeta, G., Gattei, V., & Dal Bo, M. (2017). Mutations in the 3' untranslated region of are associated with low CD20 expression levels chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, *102*(8), e305–e309.
- Blakemore, S. J., Clifford, R., Parker, H., Antoniou, P., Stec-Dziedzic, E., Larrayoz, M., Davis, Z., Kadalyayil, L., Collins, A., Robbe, P., Vavoulis, D., Forster, J., Carr, L., Morilla, R., Else, M., Bryant, D., McCarthy, H., Walewska, R. J., Steele, A. J., Strefford, J. C. (2020). Clinical significance of TP53, BIRC3, ATM and MAPK-ERK genes in chronic lymphocytic leukaemia: data from the randomised UK LRF CLL4 trial. *Leukemia*, *34*(7), 1760–1774.
- Blombery, P., Anderson, M. A., Gong, J.-N., Thijssen, R., Birkinshaw, R. W., Thompson, E. R., Teh, C. E., Nguyen, T., Xu, Z., Flensburg, C., Lew, T. E., Majewski, I. J., Gray, D. H. D., Westerman, D. A., Tam, C. S., Seymour, J. F., Czabotar, P. E., Huang, D. C. S., & Roberts, A. W. (2019). Acquisition of the Recurrent Gly101Val Mutation in BCL2 Confers Resistance to Venetoclax in Patients with Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Discovery*, *9*(3), 342–353.
- Bond, D. A., & Woyach, J. A. (2019). Targeting BTK in CLL: Beyond Ibrutinib. *Current Hematologic Malignancy Reports*, *14*(3), 197–205.
- Bosch, F., & Dalla-Favera, R. (2019). Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *16*(11), 684–701.
- Böttcher, S., Hallek, M., Ritgen, M., & Kneba, M. (2013). The role of minimal residual disease measurements in the therapy for CLL: is it ready for prime time? *Hematology/oncology Clinics of North America*, *27*(2), 267–288.
- Brander, D. M., Seymour, J. F., Ma, S., Anderson, M. A., Choi, M. Y., Kipps, T. J., Humphrey, K., Masud, A., Nandam, R., Kim, S. Y., Verdugo, M. E., & Roberts, A. W. (2018). Durability of responses on continuous therapy and following drug cessation in deep responders with venetoclax and rituximab. *Blood*, *132*(Supplement 1), 183–183.
- Brieghel, C., Kinalis, S., Yde, C. W., Schmidt, A. Y., Jønson, L., Andersen, M. A., da Cunha-Bang, C., Pedersen, L. B., Geisler, C. H., Nielsen, F. C., & Niemann, C. U. (2019). Deep targeted sequencing of in chronic lymphocytic leukemia: clinical impact at diagnosis and at time of treatment. *Haematologica*, *104*(4), 789–796.
- Brown, J. R., Hillmen, P., O'Brien, S., Barrientos, J. C., Reddy, N. M., Coutre, S. E., Tam, C. S., Mulligan, S. P., Jaeger, U., Barr, P. M., Furman, R. R., Kipps, T. J., Cymbalista, F., Thornton, P., Caligaris-Cappio, F., Delgado, J., Montillo, M., DeVos, S., Moreno, C., Byrd, J. C. (2018). Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. *Leukemia*, *32*(1), 83–91.

- Buenrostro, J. D., Corces, M. R., Lareau, C. A., Wu, B., Schep, A. N., Aryee, M. J., Majeti, R., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2018). Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation. *Cell*, *173*(6), 1535–1548.e16.
- Burger, J. A., Landau, D. A., Taylor-Weiner, A., Bozic, I., Zhang, H., Sarosiek, K., Wang, L., Stewart, C., Fan, J., Hoellenriegel, J., Sivina, M., Dubuc, A. M., Fraser, C., Han, Y., Li, S., Livak, K. J., Zou, L., Wan, Y., Konoplev, S., Wu, C. J. (2016). Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nature Communications*, *7*, 11589.
- Burger, J. A., & Wiestner, A. (2018a). Targeting B cell receptor signalling in cancer: preclinical and clinical advances. *Nature Reviews. Cancer*, *18*(3), 148–167.
- Burger, J. A., & O'Brien, S. (2018b). Evolution of CLL treatment - from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *15*(8), 510–527.
- Burger, J. A., Sivina, M., Jain, N., Kim, E., Kadia, T., Estrov, Z., Noguera-Gonzalez, G. M., Huang, X., Jorgensen, J., Li, J., Cheng, M., Clow, F., Ohanian, M., Andreeff, M., Mathew, T., Thompson, P., Kantarjian, H., O'Brien, S., Wierda, W. G., Keating, M. J. (2019). Randomized trial of ibrutinib vs ibrutinib plus rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *133*(10), 1011–1019.
- Byrd, J. C., Brown, J. R., O'Brien, S., Barrientos, J. C., Kay, N. E., Reddy, N. M., Coutre, S., Tam, C. S., Mulligan, S. P., Jaeger, U., Devereux, S., Barr, P. M., Furman, R. R., Kipps, T. J., Cymbalista, F., Pocock, C., Thornton, P., Caligaris-Cappio, F., Robak, T., RESONATE Investigators. (2014). Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *371*(3), 213–223.
- Bystry, V., Agathangelidis, A., Bikos, V., Sutton, L. A., Baliakas, P., Hadzidimitriou, A., Stamatopoulos, K., Darzentas, N., & European Research Initiative on CLL. (2015). ARResT/AssignSubsets: a novel application for robust subclassification of chronic lymphocytic leukemia based on B cell receptor IG stereotypy. *Bioinformatics*, *31*(23), 3844–3846.
- Cafforio, L., Raponi, S., Cappelli, L. V., Ilari, C., Soscia, R., De Propriis, M. S., Mariglia, P., Rigolin, G. M., Bardi, A., Peragine, N., Piciocchi, A., Arena, V., Mauro, F. R., Cuneo, A., Guarini, A., Foa, R., & Del Giudice, I. (2022). Treatment with ibrutinib does not induce a clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, *107*(1), 334–337.
- Cahill, N., Bergh, A.-C., Kanduri, M., Göransson-Kultima, H., Mansouri, L., Isaksson, A., Ryan, F., Smedby, K. E., Juliusson, G., Sundström, C., Rosén, A., & Rosenquist, R. (2013). 450K-array analysis of chronic lymphocytic leukemia cells reveals global DNA methylation to be relatively stable over time and similar in resting and proliferative compartments. *Leukemia*, *27*(1), 150–158.
- Campo, E., Cymbalista, F., Ghia, P., Jäger, U., Pospisilova, S., Rosenquist, R., Schuh, A., & Stilgenbauer, S. (2018). aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. *Haematologica*, *103*(12), 1956–1968.
- Cheson, B. D., Bennett, J. M., Grever, M., Kay, N., Keating, M. J., O'Brien, S., & Rai, K. R. (1996). National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, *87*(12), 4990–4997.
- Chiaretti, S., Marinelli, M., Del Giudice, I., Bonina, S., Piciocchi, A., Messina, M., Vignetti, M., Rossi, D., Di Maio, V., Mauro, F. R., Guarini, A., Gaidano, G., & Foà, R. (2014). NOTCH1, SF3B1, BIRC3 and TP53 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia undergoing first-line treatment: correlation with biological parameters and response to treatment. *Leukemia & Lymphoma*, *55*(12), 2785–2792.

- Chigrinova, E., Rinaldi, A., Kwee, I., Rossi, D., Rancoita, P. M. V., Strefford, J. C., Oscier, D., Stamatopoulos, K., Papadaki, T., Berger, F., Young, K. H., Murray, F., Rosenquist, R., Greiner, T. C., Chan, W. C., Orlandi, E. M., Lucioni, M., Marasca, R., Inghirami, G., Bertoni, F. (2013). Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood*, *122*(15), 2673–2682.
- Chiorazzi, N., & Stevenson, F. K. (2020). Celebrating 20 Years of IGHV Mutation Analysis in CLL. *HemaSphere*, *4*(1), e334.
- Chiorazzi, N., Chen, S.-S., & Rai, K. R. (2021). Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *11*(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035220>
- Condoluci, A., & Rossi, D. (2020). Genomic Instability and Clonal Evolution in Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical Relevance. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, *19*(2), 227–233.
- Cortese, D., Sutton, L.-A., Cahill, N., Smedby, K. E., Geisler, C., Gunnarsson, R., Juliusson, G., Mansouri, L., & Rosenquist, R. (2014). On the way towards a “CLL prognostic index”: focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia*, *28*(3), 710–713.
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *94*(6), 1840–1847.
- Davi, F., Langerak, A. W., de Septenville, A. L., Klijn, P. M., Hengeveld, P. J., Chatzidimitriou, A., Bonfiglio, S., Sutton, L.-A., Rosenquist, R., Ghia, P., Stamatopoulos, K., & ERIC, the European Research Initiative on CLL, and the EuroClonality-NGS Working Group. (2020). Immunoglobulin gene analysis in chronic lymphocytic leukemia in the era of next generation sequencing. *Leukemia*, *34*(10), 2545–2551.
- Debant, M., Hemon, P., Brigaudeau, C., Renaudineau, Y., & Mignen, O. (2015). Calcium signaling and cell fate: how can Ca²⁺ signals contribute to wrong decisions for Chronic Lymphocytic Leukemic B lymphocyte outcome? *The International Journal of Developmental Biology*, *59*(7-9), 379–389.
- Delgado, J., Nadeu, F., Colomer, D., & Campo, E. (2020). Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica*, *105*(9), 2205–2217.
- De Silva, N. S., & Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature Reviews. Immunology*, *15*(3), 137–148.
- 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. *The New England Journal of Medicine*, *343*(26), 1910–1916.
- Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., Nguyen, L. T., Ohashi, P. S., & Dick, J. E. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nature Immunology*, *11*(7), 585–593.
- Duffy, M. J., Synnott, N. C., O’Grady, S., & Crown, J. (2022). Targeting p53 for the treatment of cancer. *Seminars in Cancer Biology*, *79*, 58–67.
- Dunn-Walters, D., Townsend, C., Sinclair, E., & Stewart, A. (2018). Immunoglobulin gene analysis as a tool for investigating human immune responses. *Immunological Reviews*, *284*(1), 132–147.
- Eek, D., Blowfield, M., Krogh, C., Chung, H., & Eyre, T. A. (2021). Development of a Conceptual Model of Chronic Lymphocytic Leukemia to Better Understand the Patient Experience. *The Patient*, *14*(1), 75–87.

- Efremov, D. G., Turkalj, S., & Laurenti, L. (2020). Mechanisms of B Cell Receptor Activation and Responses to B Cell Receptor Inhibitors in B Cell Malignancies. *Cancers*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061396>
- Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A.-K., & Rizzi, M. (2014). B cell biology: an overview. *Current Allergy and Asthma Reports*, 14(5), 434.
- Eichhorst, B., Fink, A.-M., Bahlo, J., Busch, R., Kovacs, G., Maurer, C., Lange, E., Köppler, H., Kiehl, M., Sökler, M., Schlag, R., Vehling-Kaiser, U., Köchling, G., Plöger, C., Gregor, M., Plesner, T., Trneny, M., Fischer, K., Döhner, H., German CLL Study Group (GCLLSG). (2016). First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *The Lancet Oncology*, 17(7), 928–942.
- Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Niemann, C. U., Kater, A. P., Gregor, M., Cymbalista, F., Buske, C., Hillmen, P., Hallek, M., Mey, U., & ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. (2021). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 32(1), 23–33.
- Fabbri, G., Khiabani, H., Holmes, A. B., Wang, J., Messina, M., Mullighan, C. G., Pasqualucci, L., Rabadan, R., & Dalla-Favera, R. (2013). Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(11), 2273–2288.
- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S. L., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., Dighiero, G., Schroeder, H. W., Jr, Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(8), 1515–1525.
- Ferrando, A. A., & López-Otín, C. (2017). Clonal evolution in leukemia. *Nature Medicine*, 23(10), 1135–1145.
- Ferrer, G., & Montserrat, E. (2018). Critical molecular pathways in CLL therapy. *Molecular Medicine*, 24(1), 9.
- Fischer, K., Cramer, P., Busch, R., Stilgenbauer, S., Bahlo, J., Schweighofer, C. D., Böttcher, S., Staib, P., Kiehl, M., Eckart, M. J., Kranz, G., Goede, V., Elter, T., Bühler, A., Winkler, D., Kneba, M., Döhner, H., Eichhorst, B. F., Hallek, M., & Wendtner, C.-M. (2011). Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(26), 3559–3566.
- Fischer, K., Bahlo, J., Fink, A. M., Goede, V., Herling, C. D., Cramer, P., Langerbeins, P., von Tresckow, J., Engelke, A., Maurer, C., Kovacs, G., Herling, M., Tausch, E., Kreuzer, K.-A., Eichhorst, B., Böttcher, S., Seymour, J. F., Ghia, P., Marlton, P., Hallek, M. (2016). Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*, 127(2), 208–215.
- Furman, R. R., Sharman, J. P., Coutre, S. E., Cheson, B. D., Pagel, J. M., Hillmen, P., Barrientos, J. C., Zelenetz, A. D., Kipps, T. J., Flinn, I., Ghia, P., Eradat, H., Ervin, T., Lamanna, N., Coiffier, B., Pettitt, A. R., Ma, S., Stilgenbauer, S., Cramer, P., O'Brien, S. M. (2014). Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 370(11), 997–1007.

- Fürstenau, M., De Silva, N., Eichhorst, B., & Hallek, M. (2019). Minimal Residual Disease Assessment in CLL: Ready for Use in Clinical Routine? *HemaSphere*, 3(5), e287.
- Gaidano, G., & Rossi, D. (2017). The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2017(1), 329–337.
- Gángó, A., Alpár, D., Galik, B., Marosvári, D., Kiss, R., Fésüs, V., Aczél, D., Eyüpoglu, E., Nagy, N., Nagy, Á., Krizsán, S., Reiniger, L., Farkas, P., Kozma, A., Ádám, E., Tasnády, S., Réti, M., Matolcsy, A., Gyenesei, A., ... Bödör, C. (2020). Dissection of subclonal evolution by temporal mutation profiling in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 146(1), 85–93.
- Gerousi, M., Laidou, S., Gemenetzi, K., Stamatopoulos, K., & Chatzidimitriou, A. (2021). Distinctive Signaling Profiles With Distinct Biological and Clinical Implications in Aggressive CLL Subsets With Stereotyped B-Cell Receptor Immunoglobulin. *Frontiers in Oncology*, 11, 771454.
- Giudice, I. D., & Foà, R. (2019). Another step forward in the 20-year history of mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 104(2), 219–221.
- Goede, V., Fischer, K., Busch, R., Engelke, A., Eichhorst, B., Wendtner, C. M., Chagorova, T., de la Serna, J., Dilhuydy, M.-S., Illmer, T., Opat, S., Owen, C. J., Samoylova, O., Kreuzer, K.-A., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Langerak, A. W., Ritgen, M., Kneba, M., Hallek, M. (2014). Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *The New England Journal of Medicine*, 370(12), 1101–1110.
- González-Gascón Y Marín, I., Hernández-Sánchez, M., Rodríguez-Vicente, A. E., Puiggros, A., Collado, R., Luño, E., González, T., Ruiz-Xivillé, N., Ortega, M., Gimeno, E., Muñoz, C., Infante, M. S., Delgado, J., Vargas, M. T., González, M., Bosch, F., Espinet, B., Hernández-Rivas, J. M., Hernández, J. Á., & Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC) and Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH). (2018). Characterizing patients with multiple chromosomal aberrations detected by FISH in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 59(3), 633–642.
- González-Gascón-Y-Marín, I., Muñoz-Novas, C., Rodríguez-Vicente, A.-E., Quijada-Álamo, M., Hernández-Sánchez, M., Pérez-Carretero, C., Ramos-Ascanio, V., & Hernández-Rivas, J.-Á. (2021). From Biomarkers to Models in the Changing Landscape of Chronic Lymphocytic Leukemia: Evolve or Become Extinct. *Cancers*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/cancers13081782>
- González-Rincón, J., Garcia-Vela, J. A., Gómez, S., Fernández-Cuevas, B., Nova-Gurumeta, S., Pérez-Sanz, N., Alcoceba, M., González, M., Anguita, E., López-Jiménez, J., González-Barca, E., Yáñez, L., Pérez-Persona, E., de la Serna, J., Fernández-Zarzoso, M., Deben, G., Peñalver, F. J., Fernández, M. C., de Oteyza, J. P., ... García-Marco, J. A. (2021). Genomic mutation profile in progressive chronic lymphocytic leukemia patients prior to first-line chemoimmunotherapy with FCR and rituximab maintenance (REM). *PLoS One*, 16(9), e0257353.
- Grimm, D. G., Azencott, C.-A., Aicheler, F., Gieraths, U., MacArthur, D. G., Samocha, K. E., Cooper, D. N., Stenson, P. D., Daly, M. J., Smoller, J. W., Duncan, L. E., & Borgwardt, K. M. (2015). The evaluation of tools used to predict the impact of missense variants is hindered by two types of circularity. *Human Mutation*, 36(5), 513–523.
- Gruber, M., Bozic, I., Leshchiner, I., Livitz, D., Stevenson, K., Rassenti, L., Rosebrock, D., Taylor-Weiner, A., Olive, O., Goyette, R., Fernandes, S. M., Sun, J., Stewart, C., Wong, A., Cibulskis, C., Zhang, W., Reiter,

- J. G., Gerold, J. M., Gribben, J. G., Wu, C. J. (2019). Growth dynamics in naturally progressing chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, *570*(7762), 474–479.
- Guzel, O., & Guner, E. I. (2009). ISO 15189 accreditation: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory I. *Clinical Biochemistry*, *42*(4-5), 274–278.
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M. J., Montserrat, E., Rai, K. R., Kipps, T. J., & International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. (2008). 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*, *111*(12), 5446–5456.
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., Stilgenbauer, S., Rai, K. R., Byrd, J. C., Eichhorst, B., O'Brien, S., Robak, T., Seymour, J. F., & Kipps, T. J. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, *131*(25), 2745–2760.
- Hallek, M., Fischer, K., Fingerle-Rowson, G., Fink, A. M., Busch, R., Mayer, J., Hensel, M., Hopfinger, G., Hess, G., von Grünhagen, U., Bergmann, M., Catalano, J., Zinzani, P. L., Caligaris-Cappio, F., Seymour, J. F., Berrebi, A., Jäger, U., Cazin, B., Trneny, M., German Chronic Lymphocytic Leukaemia Study Group. (2010). Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, *376*(9747), 1164–1174.
- Hallek, M., Shanafelt, T. D., & Eichhorst, B. (2018). Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*, *391*(10129), 1524–1537.
- Hallek, M. (2019). Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American Journal of Hematology*, *94*(11), 1266–1287.
- Hallek, M., & Al-Sawaf, O. (2021). Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American Journal of Hematology*, *96*(12), 1679–1705.
- Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., & Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *94*(6), 1848–1854.
- Hengeveld, P. J., Levin, M.-D., Kolijn, P. M., & Langerak, A. W. (2021). Reading the B-cell receptor immunome in chronic lymphocytic leukemia: revelations and applications. *Experimental Hematology*, *93*, 14–24.
- Hengeveld, P. J., van der Klift, M. Y., Kolijn, P. M., Davi, F., Kavelaars, F. G., de Jonge, E., Robrecht, S., Assmann, J. L., Van Der Straten, L., Ritgen, M., Westerweel, P. E., Fischer, K., Goede, V., Hallek, M., Levin, M.-D., & Langerak, A. W. (2022). Detecting measurable residual disease beyond 10⁻⁴ through an IGHV leader-based NGS approach improves prognostic stratification in CLL. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2022017411>
- Herling, C. D., Abedpour, N., Weiss, J., Schmitt, A., Jachimowicz, R. D., Merkel, O., Cartolano, M., Oberbeck, S., Mayer, P., Berg, V., Thomalla, D., Kutsch, N., Stiefelhagen, M., Cramer, P., Wendtner, C.-M., Persigehl, T., Saleh, A., Altmüller, J., Nürnberg, P., Peifer, M. (2018). Clonal dynamics towards the development of venetoclax resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Communications*, *9*(1), 727.
- Herman, S. E. M., Niemann, C. U., Farooqui, M., Jones, J., Mustafa, R. Z., Lipsky, A., Saba, N., Martyr, S., Soto, S., Valdez, J., Gyamfi, J. A., Maric, I., Calvo, K. R., Pedersen, L. B., Geisler, C. H., Liu, D., Marti, G. E., Aue,

- G., & Wiestner, A. (2014). Ibrutinib-induced lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia: correlative analyses from a phase II study. *Leukemia*, *28*(11), 2188–2196.
- Hu, B., Patel, K. P., Chen, H.-C., Wang, X., Luthra, R., Routbort, M. J., Kanagal-Shamanna, R., Medeiros, L. J., Yin, C. C., Zuo, Z., Ok, C. Y., Loghavi, S., Tang, G., Tambaro, F. P., Thompson, P., Burger, J., Jain, N., Ferrajoli, A., Bose, P., ... Wierda, W. G. (2019). Association of gene mutations with time-to-first treatment in 384 treatment-naive chronic lymphocytic leukaemia patients. *British Journal of Haematology*, *187*(3), 307–318.
- Hus, I., Puła, B., & Robak, T. (2022). PI3K Inhibitors for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: Current Status and Future Perspectives. *Cancers*, *14*(6). <https://doi.org/10.3390/cancers14061571>
- Ibáñez, M., Such, E., Liquori, A., Avestisyan, G., Andreu, R., Vicente, A., Macián, M. J., Melendez, M. C., Morote-Faubel, M., Asensi, P., Lloret, M. P., Jarque, I., Picón, I., Pacios, A., Donato, E., Mas-Ochoa, C., Alonso, C., Cañigral, C., Sempere, A., Luna, I. (2022). Panel Sequencing for Clinically Oriented Variant Screening and Copy Number Detection in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, *12*(4). <https://doi.org/10.3390/diagnostics12040953>
- International LLC-IPI working group. (2016). An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (LLC-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology*, *17*(6), 779–790.
- Jacobsen, S. E. W., & Nerlov, C. (2019). Haematopoiesis in the era of advanced single-cell technologies. *Nature Cell Biology*, *21*(1), 2–8.
- Jaramillo, S., Agathangelidis, A., Schneider, C., Bahlo, J., Robrecht, S., Tausch, E., Bloehdorn, J., Hoehstetter, M., Fischer, K., Eichhorst, B., Goede, V., Hallek, M., Döhner, H., Rosenquist, R., Ghia, P., Stamatopoulos, K., & Stilgenbauer, S. (2020). Prognostic impact of prevalent chronic lymphocytic leukemia stereotyped subsets: analysis within prospective clinical trials of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Haematologica*, *105*(11), 2598–2607.
- Jeromin, S., Weissmann, S., Haferlach, C., Dicker, F., Bayer, K., Grossmann, V., Alpermann, T., Roller, A., Kohlmann, A., Haferlach, T., Kern, W., & Schnittger, S. (2014). SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*, *28*(1), 108–117.
- Jian, X., Boerwinkle, E., & Liu, X. (2014). In silico prediction of splice-altering single nucleotide variants in the human genome. *Nucleic Acids Research*, *42*(22), 13534–13544.
- Johnson, T. A., Rassenti, L. Z., & Kipps, T. J. (1997). Ig VH1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features. *Journal of Immunology*, *158*(1), 235–246.
- Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O., & Ivanov, K. I. (2017). FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*, *109*(3-4), 312–319.
- Kalina, T., Flores-Montero, J., van der Velden, V. H. J., Martin-Ayuso, M., Böttcher, S., Ritgen, M., Almeida, J., Lhermitte, L., Asnafi, V., Mendonça, A., de Tute, R., Cullen, M., Sedek, L., Vidriales, M. B., Pérez, J. J., te Marvelde, J. G., Mejstrikova, E., Hrusak, O., Szczepański, T., EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). (2012). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, *26*(9), 1986–2010.

- Kennedy, J. A., & Barabé, F. (2008). Investigating human leukemogenesis: from cell lines to in vivo models of human leukemia. *Leukemia*, *22*(11), 2029–2040.
- Kersy, O., Salmon-Divon, M., Shpilberg, O., & Hershkovitz-Rokah, O. (2021). Non-Coding RNAs in Normal B-Cell Development and in Mantle Cell Lymphoma: From Molecular Mechanism to Biomarker and Therapeutic Agent Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179490>
- Kikushige, Y. (2020). Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and the development of novel therapeutic strategies. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology: JCEH*, *60*(4), 146–158.
- Kipps, T. J., Stevenson, F. K., Wu, C. J., Croce, C. M., Packham, G., Wierda, W. G., O'Brien, S., Gribben, J., & Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews. Disease Primers*, *3*, 16096.
- Kleinstern, G., O'Brien, D. R., Li, X., Tian, S., Kabat, B. F., Rabe, K. G., Norman, A. D., Yan, H., Vachon, C. M., Boddicker, N. J., Call, T. G., Parikh, S. A., Bruins, L., Bonolo de Campos, C., Leis, J. F., Shanafelt, T. D., Ding, W., Cerhan, J. R., Kay, N. E., Braggio, E. (2020). Tumor mutational load predicts time to first treatment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and monoclonal B-cell lymphocytosis beyond the CLL international prognostic index. *American Journal of Hematology*, *95*(8), 906–917.
- Kovacs, G., Robrecht, S., Fink, A. M., Bahlo, J., Cramer, P., von Tresckow, J., Maurer, C., Langerbeins, P., Fingerle-Rowson, G., Ritgen, M., Kneba, M., Döhner, H., Stilgenbauer, S., Klapper, W., Wendtner, C.-M., Fischer, K., Hallek, M., Eichhorst, B., & Böttcher, S. (2016). Minimal Residual Disease Assessment Improves Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Who Achieve Partial Response: Comprehensive Analysis of Two Phase III Studies of the German CLL Study Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *34*(31), 3758–3765.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, *5*(4), 251–262.
- Kwok, M., Oldreive, C., Rawstron, A. C., Goel, A., Papatzikas, G., Jones, R. E., Drennan, S., Agathangelou, A., Sharma-Oates, A., Evans, P., Smith, E., Dalal, S., Mao, J., Hollows, R., Gordon, N., Hamada, M., Davies, N. J., Parry, H., Beggs, A. D., Stankovic, T. (2020). Integrative analysis of spontaneous CLL regression highlights genetic and microenvironmental interdependency in CLL. *Blood*, *135*(6), 411–428.
- Kwok, M., & Wu, C. J. (2021). Clonal Evolution of High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia: A Contemporary Perspective. *Frontiers in Oncology*, *11*, 790004.
- Lama, T. G., Kyung, D., & O'Brien, S. (2020). Mechanisms of ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia and alternative treatment strategies. *Expert Review of Hematology*, *13*(8), 871–883.
- Landau, D. A., & Wu, C. J. (2013). Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics. *Genome Medicine*, *5*(5), 47.
- Landau, D. A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A. N., Stewart, C., Reiter, J. G., Bahlo, J., Kluth, S., Bozic, I., Lawrence, M., Böttcher, S., Carter, S. L., Cibulskis, K., Mertens, D., Sougnez, C. L., Rosenberg, M., Hess, J. M., Edelman, J., Kless, S., Kneba, M., Wu, C. J. (2015). Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, *526*(7574), 525–530.
- Landau, D. A., Sun, C., Rosebrock, D., Herman, S. E. M., Fein, J., Sivina, M., Underbayev, C., Liu, D., Hoellenriegel, J., Ravichandran, S., Farooqui, M. Z. H., Zhang, W., Cibulskis, C., Zviran, A., Neuberg, D. S.,

- Livitz, D., Bozic, I., Leshchiner, I., Getz, G., Wu, C. J. (2017). The evolutionary landscape of chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib targeted therapy. *Nature Communications*, 8(1), 2185.
- Langerak, A. W., Molina, T. J., Lavender, F. L., Pearson, D., Flohr, T., Sambade, C., Schuurin, E., Al Saati, T., van Dongen, J. J. M., & van Krieken, J. H. J. M. (2007). Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 21(2), 222–229.
- Langerak, A. W., Groenen, P. J. T. A., Brüggemann, M., Beldjord, K., Bellan, C., Bonello, L., Boone, E., Carter, G. I., Catherwood, M., Davi, F., Delfau-Larue, M.-H., Diss, T., Evans, P. A. S., Gameiro, P., Garcia Sanz, R., Gonzalez, D., Grand, D., Håkansson, A., Hummel, M., van Dongen, J. J. M. (2012). EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*, 26(10), 2159–2171.
- Langerak, A. W., Brüggemann, M., Davi, F., Darzentas, N., van Dongen, J. J. M., Gonzalez, D., Cazzaniga, G., Giudicelli, V., Lefranc, M.-P., Giraud, M., Macintyre, E. A., Hummel, M., Pott, C., Groenen, P. J. T. A., Stamatopoulos, K., & EuroClonality-NGS Consortium. (2017). High-Throughput Immunogenetics for Clinical and Research Applications in Immunohematology: Potential and Challenges. *Journal of Immunology*, 198(10), 3765–3774.
- Lazarian, G., Guièze, R., & Wu, C. J. (2017). Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(9), 984–993.
- Lazarian, G., Cymbalista, F., & Baran-Marszak, F. (2022). Impact of Low-Burden Mutations in the Management of CLL. *Frontiers in Oncology*, 12, 841630.
- Liggett, L. A., & Sankaran, V. G. (2020). Unraveling Hematopoiesis through the Lens of Genomics. *Cell*, 182(6), 1384–1400.
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760.
- Li, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetic parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 27(21), 2987–2993.
- Ljungström, V., & Baliakas, P. (2021). Prognostic and Predictive Implications of Cytogenetics and Genomics. *Hematology/oncology Clinics of North America*, 35(4), 703–713.
- Logan, A. C., Zhang, B., Narasimhan, B., Carlton, V., Zheng, J., Moorhead, M., Krampf, M. R., Jones, C. D., Waqar, A. N., Faham, M., Zehnder, J. L., & Miklos, D. B. (2013). Minimal residual disease quantification using consensus primers and high-throughput IGH sequencing predicts post-transplant relapse in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 27(8), 1659–1665.
- Maity, P. C., Bilal, M., Koning, M. T., Young, M., van Bergen, C. A. M., Renna, V., Nicolò, A., Datta, M., Gentner-Göbel, E., Barendse, R. S., Somers, S. F., de Groen, R. A. L., Vermaat, J. S. P., Steinbrecher, D., Schneider, C., Tausch, E., Bittolo, T., Bomben, R., Mazzarello, A. N., Jumaa, H. (2020). is an inherited risk factor for CLL through the acquisition of a single-point mutation enabling autonomous BCR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(8), 4320–4327.
- Malcikova, J., Tausch, E., Rossi, D., Sutton, L. A., Soussi, T., Zenz, T., Kater, A. P., Niemann, C. U., Gonzalez, D., Davi, F., Gonzalez Diaz, M., Moreno, C., Gaidano, G., Stamatopoulos, K., Rosenquist, R., Stilgenbauer,

- S., Ghia, P., Pospisilova, S., & European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia (ERIC) — TP53 network. (2018). ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia*, 32(5), 1070–1080.
- Mamanova, L., Coffey, A. J., Scott, C. E., Kozarewa, I., Turner, E. H., Kumar, A., Howard, E., Shendure, J., & Turner, D. J. (2010). Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nature Methods*, 7(2), 111–118.
- Mansouri, L., Cahill, N., Gunnarsson, R., Smedby, K. E., Tjønnefjord, E., Hjalgrim, H., Juliusson, G., Geisler, C., & Rosenquist, R. (2013). NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 27(2), 512–514.
- Mansouri, L., Sutton, L.-A., Ljungström, V., Bondza, S., Arngården, L., Bhoi, S., Larsson, J., Cortese, D., Kalushkova, A., Plevova, K., Young, E., Gunnarsson, R., Falk-Sörqvist, E., Lönn, P., Muggen, A. F., Yan, X.-J., Sander, B., Enblad, G., Smedby, K. E., Rosenquist, R. (2015). Functional loss of IκBε leads to NF-κB deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(6), 833–843.
- Mansouri, L., Thorvaldsdottir, B., Sutton, L.-A., Karakatsoulis, G., Meggendorfer, M., Parker, H., Nadeu, F., Brieghel, C., Laidou, S., Moia, R., Rossi, D., Catherwood, M., Kotaskova, J., Delgado, J., Rodríguez-Vicente, A. E., Benito, R., Rigolin, G. M., Bonfiglio, S., Scarfo, L., Rosenquist, R. (2022). Different prognostic impact of recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia depending on IGHV gene somatic hypermutation status: a study by ERIC in HARMONY. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01802-y>
- Martínez-Trillos, A., Pinyol, M., Navarro, A., Aymerich, M., Jares, P., Juan, M., Rozman, M., Colomer, D., Delgado, J., Giné, E., González-Díaz, M., Hernández-Rivas, J. M., Colado, E., Rayón, C., Payer, A. R., Terol, M. J., Navarro, B., Quesada, V., Puente, X. S., Villamor, N. (2014). Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood*, 123(24), 3790–3796.
- McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R. S., Thormann, A., Flicek, P., & Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, 17(1), 122.
- Melchers, F. (2015). Checkpoints that control B cell development. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(6), 2203–2210.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews. Genetics*, 11(1), 31–46.
- Miller, C. A., McMichael, J., Dang, H. X., Maher, C. A., Ding, L., Ley, T. J., Mardis, E. R., & Wilson, R. K. (2016). Visualizing tumor evolution with the fishplot package for R. *BMC Genomics*, 17(1), 880.
- Monter, A., & Nomdedéu, J. F. (2019). ClonoSEQ assay for the detection of lymphoid malignancies. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 19(7), 571–578.
- Moreno, C., & Mora, A. (2021). MRD in CLL: some answers, many questions [Review of MRD in CLL: some answers, many questions]. *Blood*, 138(26), 2746–2747.
- Munir, T., Brown, J. R., O'Brien, S., Barrientos, J. C., Barr, P. M., Reddy, N. M., Coutre, S., Tam, C. S., Mulligan, S. P., Jaeger, U., Kipps, T. J., Moreno, C., Montillo, M., Burger, J. A., Byrd, J. C., Hillmen, P., Dai, S., Szoke,

- A., Dean, J. P., & Woyach, J. A. (2019). Final analysis from RESONATE: Up to six years of follow-up on ibrutinib in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. *American Journal of Hematology*, *94*(12), 1353–1363.
- Mukkamalla, S. K. R., Taneja, A., Malipeddi, D., & Master, S. R. (2022). Chronic Lymphocytic Leukemia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Muzio, M., Apollonio, B., Scielzo, C., Frenquelli, M., Vandoni, I., Boussiotis, V., Caligaris-Cappio, F., & Ghia, P. (2008). Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*, *112*(1), 188–195.
- Nadeu, F., Delgado, J., Royo, C., Baumann, T., Stankovic, T., Pinyol, M., Jares, P., Navarro, A., Martín-García, D., Beà, S., Salaverria, I., Oldreive, C., Aymerich, M., Suárez-Cisneros, H., Rozman, M., Villamor, N., Colomer, D., López-Guillermo, A., González, M., Campo, E. (2016). Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *127*(17), 2122–2130.
- Nadeu, F., Clot, G., Delgado, J., Martín-García, D., Baumann, T., Salaverria, I., Beà, S., Pinyol, M., Jares, P., Navarro, A., Suárez-Cisneros, H., Aymerich, M., Rozman, M., Villamor, N., Colomer, D., González, M., Alcoceba, M., Terol, M. J., Navarro, B., Campo, E. (2018). Clinical impact of the subclonal architecture and mutational complexity in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *32*(3), 645–653.
- Nadeu, F., Diaz-Navarro, A., Delgado, J., Puente, X. S., & Campo, E. (2020). Genomic and Epigenomic Alterations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Annual Review of Pathology*, *15*, 149–177.
- Nadeu, F., Royo, R., Massoni-Badosa, R., Playa-Albinyana, H., Garcia-Torre, B., Duran-Ferrer, M., Dawson, K. J., Kulis, M., Diaz-Navarro, A., Villamor, N., Melero, J. L., Chapaprieta, V., Dueso-Barroso, A., Delgado, J., Moia, R., Ruiz-Gil, S., Marchese, D., Giró, A., Verdaguer-Dot, N., Campo, E. (2022). Detection of early seeding of Richter transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Medicine*, *28*(8), 1662–1671.
- Nakagawa, R., & Calado, D. P. (2021). Positive Selection in the Light Zone of Germinal Centers. *Frontiers in Immunology*, *12*, 661678.
- Nemazee, D. (2017). Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nature Reviews. Immunology*, *17*(5), 281–294.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, *194*(4260), 23–28.
- Ojha, J., Ayres, J., Secreto, C., Tschumper, R., Rabe, K., Van Dyke, D., Slager, S., Shanafelt, T., Fonseca, R., Kay, N. E., & Braggio, E. (2015). Deep sequencing identifies genetic heterogeneity and recurrent convergent evolution in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *125*(3), 492–498.
- Orkin, S. H., & Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, *132*(4), 631–644.
- Parikh, S. A., & Shanafelt, T. D. (2016). Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Oncology*, *43*(2), 233–240.
- Petrackova, A., Savara, J., Turcsanyi, P., Gajdos, P., Papajik, T., & Kriegova, E. (2022). Rare germline ATM variants of uncertain significance in chronic lymphocytic leukaemia and other cancers. *British Journal of Haematology*, *199*(3), 371–381.

- Pflug, N., Bahlo, J., Shanafelt, T. D., Eichhorst, B. F., Bergmann, M. A., Elter, T., Bauer, K., Malchau, G., Rabe, K. G., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Jäger, U., Eckart, M. J., Hopfinger, G., Busch, R., Fink, A.-M., Wendtner, C.-M., Fischer, K., Kay, N. E., & Hallek, M. (2014). Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *124*(1), 49–62.
- Pickrell, W. O., Rees, M. I., & Chung, S.-K. (2012). Next generation sequencing methodologies--an overview. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, *89*, 1–26.
- Pozzo, F., Bittolo, T., Tissino, E., Zucchetto, A., Bomben, R., Polcik, L., Dannewitz Prosseda, S., Hartmann, T. N., & Gattei, V. (2022). Multiple Mechanisms of NOTCH1 Activation in Chronic Lymphocytic Leukemia: NOTCH1 Mutations and Beyond. *Cancers*, *14*(12). <https://doi.org/10.3390/cancers14122997>
- Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordóñez, G. R., Villamor, N., Escaramis, G., Jares, P., Beà, S., González-Díaz, M., Bassaganyas, L., Baumann, T., Juan, M., López-Guerra, M., Colomer, D., Tubío, J. M. C., López, C., Navarro, A., Tornador, C., Campo, E. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, *475*(7354), 101–105.
- Puente, X. S., Beà, S., Valdés-Mas, R., Villamor, N., Gutiérrez-Abril, J., Martín-Subero, J. I., Munar, M., Rubio-Pérez, C., Jares, P., Aymerich, M., Baumann, T., Beekman, R., Berver, L., Carrio, A., Castellano, G., Clot, G., Colado, E., Colomer, D., Costa, D., Campo, E. (2015). Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, *526*(7574), 519–524.
- Puiggros, A., Blanco, G., & Espinet, B. (2014). Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *BioMed Research International*, *2014*, 435983.
- Puiggros, A., Collado, R., Calasanz, M. J., Ortega, M., Ruiz-Xivillé, N., Rivas-Delgado, A., Luño, E., González, T., Navarro, B., García-Malo, M., Valiente, A., Hernández, J. Á., Ardanaz, M. T., Piñan, M. Á., Blanco, M. L., Hernández-Sánchez, M., Batlle-López, A., Salgado, R., Salido, M., Espinet, B. (2017). Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of deletions. *Oncotarget*, *8*(33), 54297–54303.
- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., & Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *46*(2), 219–234.
- Ramos, C. V., & Martins, V. C. (2021). Cell competition in hematopoietic cells: Quality control in homeostasis and its role in leukemia. *Developmental Biology*, *475*, 1–9.
- Rawstron, A. C., Fazi, C., Agathangelidis, A., Villamor, N., Letestu, R., Nomdedeu, J., Palacio, C., Stehlikova, O., Kreuzer, K.-A., Liptrot, S., O'Brien, D., de Tute, R. M., Marinov, I., Hauwel, M., Spacek, M., Dobber, J., Kater, A. P., Gambell, P., Soosapilla, A., Ghia, P. (2016). A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia*, *30*(4), 929–936.
- Rawstron, A. C., Kreuzer, K.-A., Soosapilla, A., Spacek, M., Stehlikova, O., Gambell, P., McIver-Brown, N., Villamor, N., Psarra, K., Arroz, M., Milani, R., de la Serna, J., Cedena, M. T., Jaksic, O., Nomdedeu, J., Moreno, C., Rigolin, G. M., Cuneo, A., Johansen, P., Montserrat, E. (2018). Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, *94*(1), 121–128.
- Reed, J. H. (2022). Transforming mutations in the development of pathogenic B cell clones and autoantibodies. *Immunological Reviews*, *307*(1), 101–115.

- René, C., Prat, N., Thuizat, A., Broctawik, M., Avinens, O., & Eliaou, J.-F. (2014). Comprehensive characterization of immunoglobulin gene rearrangements in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *18*(6), 979–990.
- Rickert, R. C. (2013). New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nature Reviews. Immunology*, *13*(8), 578–591.
- Rigolin, G. M., 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., Mesticelli, F., Testa, N., Negrini, M., & Cuneo, A. (2012). Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with “normal” FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood*, *119*(10), 2310–2313.
- Roberts, A. W., Davids, M. S., Pagel, J. M., Kahl, B. S., Puvvada, S. D., Gerecitano, J. F., Kipps, T. J., Anderson, M. A., Brown, J. R., Gressick, L., Wong, S., Dunbar, M., Zhu, M., Desai, M. B., Cerri, E., Heitner Enschede, S., Humerickhouse, R. A., Wierda, W. G., & Seymour, J. F. (2016). Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *374*(4), 311–322.
- Roberts, A. W., Ma, S., Kipps, T. J., Coutre, S. E., Davids, M. S., Eichhorst, B., Hallek, M., Byrd, J. C., Humphrey, K., Zhou, L., Chyla, B., Nielsen, J., Potluri, J., Kim, S. Y., Verdugo, M., Stilgenbauer, S., Wierda, W. G., & Seymour, J. F. (2019). Efficacy of venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia is influenced by disease and response variables. *Blood*, *134*(2), 111–122.
- Rodrigues, C. P., Shvedunova, M., & Akhtar, A. (2020). Epigenetic Regulators as the Gatekeepers of Hematopoiesis. *Trends in Genetics: TIG*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.09.015>
- Rosati, E., Baldoni, S., De Falco, F., Del Papa, B., Dorillo, E., Rompietti, C., Albi, E., Falzetti, F., Di Ianni, M., & Sportoletti, P. (2018). NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Frontiers in Oncology*, *8*, 229.
- Rosenquist, R., Ghia, P., Hadzidimitriou, A., Sutton, L.-A., Agathangelidis, A., Baliakas, P., Darzentas, N., Giudicelli, V., Lefranc, M.-P., Langerak, A. W., Belessi, C., Davi, F., & Stamatopoulos, K. (2017). Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia*, *31*(7), 1477–1481.
- Rose-Zerilli, M. J. J., Forster, J., Parker, H., Parker, A., Rodríguez, A. E., Chaplin, T., Gardiner, A., Steele, A. J., Collins, A., Young, B. D., Skowronska, A., Catovsky, D., Stankovic, T., Oscier, D. G., & Strefford, J. C. (2014). ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica*, *99*(4), 736–742.
- Rossi, D., Sozzi, E., Puma, A., De Paoli, L., Rasi, S., Spina, V., Gozzetti, A., Tassi, M., Cencini, E., Raspadori, D., Pinto, V., Bertoni, F., Gattei, V., Lauria, F., Gaidano, G., & Forconi, F. (2009). The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *British Journal of Haematology*, *146*(1), 64–75.
- Rossi, D., & Gaidano, G. (2010). Biological and clinical significance of stereotyped B-cell receptors in chronic lymphocytic leukemia [Review of *Biological and clinical significance of stereotyped B-cell receptors in chronic lymphocytic leukemia*]. *Haematologica*, *95*(12), 1992–1995.
- Rossi, D., Bruscaggin, A., Spina, V., Rasi, S., Khiabani, H., Messina, M., Fangazio, M., Vaisitti, T., Monti, S., Chiaretti, S., Guarini, A., Del Giudice, I., Cerri, M., Cresta, S., Deambrogi, C., Gargiulo, E., Gattei, V.,

- Forconi, F., Bertoni, F., Gaidano, G. (2011). Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*, *118*(26), 6904–6908.
- Rossi, D., Fangazio, M., Rasi, S., Vaisitti, T., Monti, S., Cresta, S., Chiaretti, S., Del Giudice, I., Fabbri, G., Bruscaggin, A., Spina, V., Deambrogi, C., Marinelli, M., Famà, R., Greco, M., Daniele, G., Forconi, F., Gattei, V., Bertoni, F., Gaidano, G. (2012a). Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *119*(12), 2854–2862.
- Rossi, D., Rasi, S., Fabbri, G., Spina, V., Fangazio, M., Forconi, F., Marasca, R., Laurenti, L., Bruscaggin, A., Cerri, M., Monti, S., Cresta, S., Famà, R., De Paoli, L., Bulian, P., Gattei, V., Guarini, A., Deaglio, S., Capello, D., Gaidano, G. (2012b). Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *119*(2), 521–529.
- Rossi, D., Rasi, S., Spina, V., Bruscaggin, A., Monti, S., Ciardullo, C., Deambrogi, C., Khiabani, H., Serra, R., Bertoni, F., Forconi, F., Laurenti, L., Marasca, R., Dal-Bo, M., Rossi, F. M., Bulian, P., Nomdedeu, J., Del Poeta, G., Gattei, V., ... Gaidano, G. (2013). Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *121*(8), 1403–1412.
- Rossi, D., Khiabani, H., Spina, V., Ciardullo, C., Bruscaggin, A., Famà, R., Rasi, S., Monti, S., Deambrogi, C., De Paoli, L., Wang, J., Gattei, V., Guarini, A., Foà, R., Rabadan, R., & Gaidano, G. (2014). Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *123*(14), 2139–2147.
- Rossi, D., Bertoni, F., & Zucca, E. (2022). Marginal-Zone Lymphomas. *The New England Journal of Medicine*, *386*(6), 568–581.
- Schroeder, H. W., Jr, & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 Suppl 2), S41–S52.
- Schuh, A., Becq, J., Humphray, S., Alexa, A., Burns, A., Clifford, R., Feller, S. M., Grocock, R., Henderson, S., Khrebtukova, I., Kingsbury, Z., Luo, S., McBride, D., Murray, L., Menju, T., Timbs, A., Ross, M., Taylor, J., & Bentley, D. (2012). Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood*, *120*(20), 4191–4196.
- Sedlarikova, L., Petrackova, A., Papajik, T., Turcsanyi, P., & Kriegova, E. (2020). Resistance-Associated Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Treated With Novel Agents. *Frontiers in Oncology*, *10*, 894.
- Seymour, J. F., Ma, S., Brander, D. M., Choi, M. Y., Barrientos, J., Davids, M. S., Anderson, M. A., Beaven, A. W., Rosen, S. T., Tam, C. S., Prine, B., Agarwal, S. K., Munasinghe, W., Zhu, M., Lash, L. L., Desai, M., Cerri, E., Verdugo, M., Kim, S. Y., Roberts, A. W. (2017). Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. *The Lancet Oncology*, *18*(2), 230–240.
- Shaffer, A. L., 3rd, Young, R. M., & Staudt, L. M. (2012). Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annual Review of Immunology*, *30*, 565–610.
- Shanafelt, T. D., Wang, X. V., Kay, N. E., Hanson, C. A., O'Brien, S., Barrientos, J., Jelinek, D. F., Braggio, E., Leis, J. F., Zhang, C. C., Coutre, S. E., Barr, P. M., Cashen, A. F., Mato, A. R., Singh, A. K., Mullane, M. P., Little, R. F., Erba, H., Stone, R. M., Tallman, M. (2019). Ibrutinib-Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *381*(5), 432–443.
- Singh, R. R. (2020). Next-Generation Sequencing in High-Sensitive Detection of Mutations in Tumors: Challenges, Advances, and Applications. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, *22*(8), 994–1007.

- Skowronska, A., Parker, A., Ahmed, G., Oldreive, C., Davis, Z., Richards, S., Dyer, M., Matutes, E., Gonzalez, D., Taylor, A. M. R., Moss, P., Thomas, P., Oscier, D., & Stankovic, T. (2012). Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *30*(36), 4524–4532.
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology / Edited by Frederick M. Ausubel [et Al.]*, *122*(1), e59.
- Smith, B. P., & Roman, C. A. J. (2010). The unique and immunoglobulin-like regions of surrogate light chain component lambda5 differentially interrogate immunoglobulin heavy-chain structure. *Molecular Immunology*, *47*(6), 1195–1206.
- Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., & de Villartay, J.-P. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene*, *26*(56), 7780–7791.
- Spencer, D. H., Tyagi, M., Vallania, F., Bredemeyer, A. J., Pfeifer, J. D., Mitra, R. D., & Duncavage, E. J. (2014). Performance of common analysis methods for detecting low-frequency single nucleotide variants in targeted next-generation sequence data. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, *16*(1), 75–88.
- Stamatopoulos, B., Timbs, A., Bruce, D., Smith, T., Clifford, R., Robbe, P., Burns, A., Vavoulis, D. V., Lopez, L., Antoniou, P., Mason, J., Dreau, H., & Schuh, A. (2017). Targeted deep sequencing reveals clinically relevant subclonal IgHV rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *31*(4), 837–845.
- Stamatopoulos, B., Smith, T., Crompton, E., Pieters, K., Clifford, R., Mraz, M., Robbe, P., Burns, A., Timbs, A., Bruce, D., Hillmen, P., Meuleman, N., Mineur, P., Firescu, R., Maerevoet, M., De Wilde, V., Eflira, A., Philippé, J., Verhasselt, B., Schuh, A. (2018). The Light Chain IgLV3-21 Defines a New Poor Prognostic Subgroup in Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of a Multicenter Study. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *24*(20), 5048–5057.
- Stilgenbauer, S., Schnaiter, A., Paschka, P., Zenz, T., Rossi, M., Döhner, K., Bühler, A., Böttcher, S., Ritgen, M., Kneba, M., Winkler, D., Tausch, E., Hoth, P., Edelmann, J., Mertens, D., Bullinger, L., Bergmann, M., Kless, S., Mack, S., Döhner, H. (2014). Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*, *123*(21), 3247–3254.
- St-Pierre, F., & Ma, S. (2022). Use of BTK Inhibitors in Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma (CLL/SLL): A Practical Guidance. *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy*, *12*, 81–98.
- Surova, E., & Jumaa, H. (2014). The role of BCR isotype in B-cell development and activation. *Advances in Immunology*, *123*, 101–139.
- Sutton, L.-A., & Rosenquist, R. (2015). Deciphering the molecular landscape in chronic lymphocytic leukemia: time frame of disease evolution. *Haematologica*, *100*(1), 7–16.
- Sutton, L.-A., Hadzidimitriou, A., Baliakas, P., Agathangelidis, A., Langerak, A. W., Stilgenbauer, S., Pospisilova, S., Davis, Z., Forconi, F., Davi, F., Ghia, P., Rosenquist, R., Stamatopoulos, K., & European Research Initiative on CLL (ERIC). (2017). Immunoglobulin genes in chronic lymphocytic leukemia: key to understanding the disease and improving risk stratification. *Haematologica*, *102*(6), 968–971.

- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., & Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, *127*(20), 2375–2390.
- Tausch, E., Beck, P., Schlenk, R. F., Jebaraj, B. J., Dolnik, A., Yosifov, D. Y., Hillmen, P., Offner, F., Janssens, A., Babu, G. K., Grosicki, S., Mayer, J., Panagiotidis, P., McKeown, A., Gupta, I. V., Skorupa, A., Pallaud, C., Bullinger, L., Mertens, D., Stilgenbauer, S. (2020). Prognostic and predictive role of gene mutations in chronic lymphocytic leukemia: results from the pivotal phase III study COMPLEMENT1. *Haematologica*, *105*(10), 2440–2447.
- Tausch, E., Close, W., Dolnik, A., Bloehdorn, J., Chyla, B., Bullinger, L., Döhner, H., Mertens, D., & Stilgenbauer, S. (2019). Venetoclax resistance and acquired mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, *104*(9), e434–e437.
- ten Hacken, E., & Burger, J. A. (2014). Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. *Pharmacology & Therapeutics*, *144*(3), 338–348.
- Thompson, P. A., O'Brien, S. M., Xiao, L., Wang, X., Burger, J. A., Jain, N., Ferrajoli, A., Estrov, Z., Keating, M. J., & Wierda, W. G. (2016a). $\beta 2$ -microglobulin normalization within 6 months of ibrutinib-based treatment is associated with superior progression-free survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, *122*(4), 565–573.
- Thompson, P. A., Tam, C. S., O'Brien, S. M., Wierda, W. G., Stingo, F., Plunkett, W., Smith, S. C., Kantarjian, H. M., Freireich, E. J., & Keating, M. J. (2016b). Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *127*(3), 303–309.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, *14*(2), 178–192.
- Tobin, G., Thunberg, U., Johnson, A., Thörn, I., Söderberg, O., Hultdin, M., Botling, J., Enblad, G., Sällström, J., Sundström, C., Roos, G., & Rosenquist, R. (2002). Somatic mutations of Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *99*(6), 2262–2264.
- Tresckow, J. von, Eichhorst, B., Bahlo, J., & Hallek, M. (2019). The Treatment of Chronic Lymphatic Leukemia. *Deutsches Arzteblatt International*, *116*(4), 41–46.
- van Dongen, J. J. M., Langerak, A. W., Brüggemann, M., Evans, P. A. S., Hummel, M., Lavender, F. L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., García-Sanz, R., van Krieken, J. H. J. M., Droese, J., González, D., Bastard, C., White, H. E., Spaargaren, M., González, M., Parreira, A., Smith, J. L., Macintyre, E. A. (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, *17*(12), 2257–2317.
- Verma, M., Kulshrestha, S., & Puri, A. (2017). Genome Sequencing. *Methods in Molecular Biology*, *1525*, 3–33.
- Victoria, G. D., & Nussenzweig, M. C. (2022). Germinal Centers. *Annual Review of Immunology*, *40*, 413–442.
- Wang, E., Mi, X., Thompson, M. C., Montoya, S., Notti, R. Q., Afaghani, J., Durham, B. H., Penson, A., Witkowski, M. T., Lu, S. X., Bourcier, J., Hogg, S. J., Erickson, C., Cui, D., Cho, H., Singer, M., Totiger, T. M.,

- Chaudhry, S., Geyer, M., Abdel-Wahab, O. (2022). Mechanisms of Resistance to Noncovalent Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors. *The New England Journal of Medicine*, 386(8), 735–743.
- Warner, J. K., Wang, J. C. Y., Hope, K. J., Jin, L., & Dick, J. E. (2004). Concepts of human leukemic development. *Oncogene*, 23(43), 7164–7177.
- Wierda, W. G., O'Brien, S., Wang, X., Faderl, S., Ferrajoli, A., Do, K.-A., Cortes, J., Thomas, D., Garcia-Manero, G., Koller, C., Beran, M., Giles, F., Ravandi, F., Lerner, S., Kantarjian, H., & Keating, M. (2007). Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 109(11), 4679–4685.
- Wierda, W. G., Kipps, T. J., Mayer, J., Stilgenbauer, S., Williams, C. D., Hellmann, A., Robak, T., Furman, R. R., Hillmen, P., Trnety, M., Dyer, M. J. S., Padmanabhan, S., Piotrowska, M., Kozak, T., Chan, G., Davis, R., Losic, N., Wilms, J., Russell, C. A., Hx-CD20-406 Study Investigators. (2010). Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(10), 1749–1755.
- Wierda, W. G., Rawstron, A., Cymbalista, F., Badoux, X., Rossi, D., Brown, J. R., Egle, A., Abello, V., Cervera Ceballos, E., Herishanu, Y., Mulligan, S. P., Niemann, C. U., Diong, C. P., Soysal, T., Suzuki, R., Tran, H. T. T., Wu, S.-J., Owen, C., Stilgenbauer, S., Hillmen, P. (2021). Measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia: expert review and consensus recommendations. *Leukemia*, 35(11), 3059–3072.
- Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T. S., Wright, G., Davis, R. E., Henrikson, S. E., Zhao, H., Ibbotson, R. E., Orchard, J. A., Davis, Z., Stetler-Stevenson, M., Raffeld, M., Arthur, D. C., Marti, G. E., Wilson, W. H., Hamblin, T. J., Oscier, D. G., & Staudt, L. M. (2003). ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*, 101(12), 4944–4951.
- Winkler, T. H., & Mårtensson, I.-L. (2018). The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance. *Frontiers in Immunology*, 9, 2423.
- Woyach, J. A., Furman, R. R., Liu, T.-M., Ozer, H. G., Zapatka, M., Ruppert, A. S., Xue, L., Li, D. H.-H., Steggerda, S. M., Versele, M., Dave, S. S., Zhang, J., Yilmaz, A. S., Jaglowski, S. M., Blum, K. A., Lozanski, A., Lozanski, G., James, D. F., Barrientos, J. C., Byrd, J. C. (2014). Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *The New England Journal of Medicine*, 370(24), 2286–2294.
- Woyach, J. A., Ruppert, A. S., Guinn, D., Lehman, A., Blachly, J. S., Lozanski, A., Heerema, N. A., Zhao, W., Coleman, J., Jones, D., Abruzzo, L., Gordon, A., Mantel, R., Smith, L. L., McWhorter, S., Davis, M., Doong, T.-J., Ny, F., Lucas, M., Byrd, J. C. (2017). BTK-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(13), 1437–1443.
- Young, E., Noerenberg, D., Mansouri, L., Ljungström, V., Frick, M., Sutton, L.-A., Blakemore, S. J., Galan-Sousa, J., Plevova, K., Baliakas, P., Rossi, D., Clifford, R., Roos-Weil, D., Navrkalova, V., Dörken, B., Schmitt, C. A., Smedby, K. E., Juliusson, G., Giacomelli, B., Damm, F. (2017). EGR2 mutations define a new clinically aggressive subgroup of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 31(7), 1547–1554.
- Young, R. M., & Staudt, L. M. (2013). Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 12(3), 229–243.
- Yun, X., Zhang, Y., & Wang, X. (2020). Recent progress of prognostic biomarkers and risk scoring systems in chronic lymphocytic leukemia. *Biomarker Research*, 8, 40.

- Zapatka, M., Tausch, E., Öztürk, S., Yosifov, D. Y., Seiffert, M., Zenz, T., Schneider, C., Blöhdorn, J., Döhner, H., Mertens, D., Lichter, P., & Stilgenbauer, S. (2022). Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia is scant in relapsed but accelerated in refractory cases after chemo(immune) therapy. *Haematologica*, *107*(3), 604–614.
- Zehentmeier, S., & Pereira, J. P. (2019). Cell circuits and niches controlling B cell development. *Immunological Reviews*, *289*(1), 142–157.
- Zenz, T., Eichhorst, B., Busch, R., Denzel, T., Häbe, S., Winkler, D., Bühler, A., Edelmann, J., Bergmann, M., Hopfinger, G., Hensel, M., Hallek, M., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2010a). TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *28*(29), 4473–4479.
- Zenz, T., Fröhling, S., Mertens, D., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2010b). Moving from prognostic to predictive factors in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, *23*(1), 71–84.
- Zenz, T., Vollmer, D., Trbusek, M., Smardova, J., Benner, A., Soussi, T., Helfrich, H., Heuberger, M., Hoth, P., Fuge, M., Denzel, T., Häbe, S., Malcikova, J., Kuglik, P., Truong, S., Patten, N., Wu, L., Oscier, D., Ibbotson, R., ... European Research Initiative on CLL (ERIC). (2010c). TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*, *24*(12), 2072–2079.
- Zhang, S., & Kipps, T. J. (2014). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annual Review of Pathology*, *9*, 103–118.
- Zhu, X., Li, S., Xu, B., & Luo, H. (2021). Cancer evolution: A means by which tumors evade treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *133*, 111016.

Anexo

9 Anexo: tablas.

9.1 Anexo 1: Materiales y métodos

Anexo 1: Tabla 1 Preparación de las mezclas de muestras para el estudio de sensibilidad y especificidad del método IBR-R, a distintos porcentajes de mutación (TE1x, tampón TE, TrisEDTA, pH 8.0, Sigma-Aldrich).

	Concentración [ng/μL]	Ratio 260/280			
Control_BTK_pl4	200	1,80			
Control_PLCG2_pl3	200	1,81			
Control_WT	100,1	1,84			
Preparación IBR-R1 a 100ng/μL y al 10% de cada una de las mutaciones					
	Mutación portadora	[ADN]ng/ μL	Vol Muestra (μL)	Vol TE1X (μL)	Vol final (μL)
Control_BTK_pl4	p.Cys481Ser	200	10	10	20
Control_PLCG2_pl3	p.Pro664Ser	200	10	10	20
Control_WT	-	100,1	19,98	0,02	20
Total:				20	60
Preparación IBR-R2 al 5% de cada una de las mutaciones					
	Vol. 0% MUT (WT) (μL)	Vol. al 10% (IBR-R1) (μL)	Vol. final al 5% de MUT (μL)		
IBR-R2	20	20	40		
Preparación IBR-R3 al 2% de cada una de las mutaciones					
	Vol. 0% MUT (WT) (μL)	Vol. al 5% (IBR-R2) (μL)	Vol. final al 2% de MUT (μL)		
IBR-R3	24	16	40		
Preparación IBR-R4 al 1% de cada una de las mutaciones					
	Vol. 0% MUT (WT) (μL)	Vol. al 2% (IBR-R3) (μL)	Vol. final al 1% de MUT (μL)		
IBR-R4	24	16	40		

Anexo 1: Tabla 2 Cebadores para acotar locus IGVH mediante Secuenciación Sanger.

Región acotada gen IGVH	Cebador	Secuencia 5'-3'
Leader	Leader_IGHV1:	CCATGGACTGGACCTGGA
	Leader_IGHV2:	ATGGACATACTTTGTTCCAC
	Leader_IGHV3:	CCATGGAGTTTGGGCTGAGC
	Leader_IGHV3-21*:	CCATGGAAGTGGGGCTCCGC
	Leader_IGHV4:	ATGAAACACCTGTGGTTCTT
	Leader_IGHV5:	ATGGGGTCAACCGCATCCT
	Leader_IGHV6:	ATGTCTGTCTCCTTCCTCAT
FR1	FR1_VH1:	GGCCTCAGTGAAGTCTCCTGCAAG
	FR1_VH2:	GTCTGGTCTACGCTGGTGAACCC
	FR1_VH3:	CTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTG
	FR1_VH4:	CTTCGGAGACCCTGTCCTCACCTG
	FR1_VH5:	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT
	FR1_VH6:	TCGAGACCCTCTCACTCACCTGTG
IGJH	JH	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC

Anexo 1: Tabla 3 Cebadores para acotar locus IGVH mediante NGS.

IGVH	Cebador	Secuencia 5'-3'
FR1	FR1_VH1:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
	FR1_VH2:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTCTGGTCTACGCTGGTGAAACCC
	FR1_VH3:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
	FR1_VH4:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTTCGGAGACCCTGTCCTCACCTG
	FR1_VH5:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT
	FR1_VH6:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCGAGACCCTCTCACTCACCTGTG
FR2	FR2_VH1:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
	FR2_VH2:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGG
	FR2_VH3:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
	FR2_VH4:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG
	FR2_VH5:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGG
	FR2_VH6:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAG
	FR2_VH7:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
FR3	FR3_VH1:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA
	FR3_VH2:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAATGACCAACATGGACCCTGTGGA
	FR3_VH3:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
	FR3_VH4:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGCTCTGTGACCGCCGCGACACG
	FR3_VH5:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGCACCCGCTACCTGCAGTGGAGC
	FR3_VH6:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG
	FR3_VH7:	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGCACGGCATATCTGCAGATCAG
IGJH	JH	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTTACCTGAGGAGACGGTGACC

9.2 Anexo 2: Resultados

Anexo 2: Tabla 1 Listado de cariotipos alterados disponibles de pacientes con LLC al diagnóstico y pretratamiento.

Caso	Diagnóstico	Cariotipo	Meses entre muestras	Pretratamiento	Cariotipo
LLC-100	46,XY,del(11)(q13q23)[9]/46,XY[11]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	0	46,XY,del(11)(q13q23)[9]/46,XY[11]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-11	46,XX[20]	Normal	70	46,XX,add(2)/p25[12]/46XX[18]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-2	ND	ND	6	45XY,der(17,18)(q10;q10)[3]/46XY[9]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-4	47,XY,+12[6]/46,XY[34]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	237	47XY,+12[3]/46XY[18]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-42	46,XX,9(qh+)[20]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	ND	ND	ND
LLC-43	46,XY,del(11)(q22)[2]/46,XY[10]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	0	46,XY,del(11)(q22)[2]/46,XY[10]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-44	46,XY,+12[17]/46,XY[3]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	38	46,XY,+12[19]/46,XY[1]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-45	46,XX,del(13)(q14)[4]/46,XX[16]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	0	46,XX,del(13)(q14)[4]/46,XX[16]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-48	47,XY,+12,del(14)(q21)[18]/46,XY[2]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	0	47,XY,+12,del(14)(q21)[18]/46,XY[2]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-51	46,XY,del(13)(q14),del(17)(p11)[12]/45,XY,der(17)ins(17;18)(p11;p11),18[5]/46,XY[3]	Complejidad intermedia con 4 lesiones	0	46,XY,del(13)(q14),del(17)(p11)[12]/45,XY,der(17)ins(17;18)(p11;p11),18[5]/46,XY[3]	Complejidad intermedia con 4 lesiones
LLC-53	46XY[20]	Normal	13	46,XY,t(2;8)(q32;q13),del(11)(q21q23)[4]/46,XY[16]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-54	46,XY,t(1;14)[14]/46,XY[6]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	131	46,XY,t(1;14)[18]/46,XY[2]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-59	ND	ND	77	47,XY,+12[16]/46,XY[4]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-6	46XY,del(14)(q22)[3]/46XY[27]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	95	45,46,XY,Y,del(6)(q13q24),10,14,del(14)(q21),mr1,mr2,mr3[8]/46,XY[12]	Complejidad intermedia con 5 lesiones
LLC-60	45,XY,dic(8;4)(p11;p11)[2]/46,XY[18]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	10	46,XY,del(11)(q22),del(13)(q31)[7]/46,XY[13]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-61	45,XX,del(11)(q23),rob(13;14)(q10;q10)[6]/45,XX,rob(13;14)(q10;q10)[14]	Complejidad baja con 3 lesiones	0	45,XX,del(11)(q23),rob(13;14)(q10;q10)[6]/45,XX,rob(13;14)(q10;q10)[14]	Complejidad baja con 3 lesiones
LLC-62	46,XX[10]	Normal	48	46,XX,t(6;19)(p11;p11),t(8;16)(p11;p11),9,+16[9]/46XX[11]	Complejidad intermedia con 4 lesiones
LLC-63	46,XX,+12[3]/46,XX[4]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	23	45,X,X[2]/46,XX[18]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-65	ND	ND	20	46,XX,t(2;18)(p11;q21)[13]/46,XX[7]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-67	ND	ND	24	46,XY,t(4;13)(q21;q31)[4]/46,XY[16]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-75	46,XY,del(11)(q22)[2]/46,X[6]/46,XY[12]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	8	46,XY,del(11)(q22)[2]/46,XY[18]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-82	47,XY,+21[5]/46,XY,21[2]/46,XY[13]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	89	ND	ND
LLC-84	47,XY,+12[5]/46,XX[15]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	55	ND	ND
LLC-85	ND	ND	112	46,XX,del(6)(q13q24)[15]/46,XX[5]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-87	ND	ND	51	47,XY,+12[15]/46,XY[5]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-95	46,XY,del(11)(q22)[13]/46,XY[7]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	89	46,XY,del(11)(q22)[16]/46,XY[4]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-97	46,XY[20]	Normal	42	46,XY,add(18)(q23)[11]/46XY[9]	1 ó 2 anomalías cromosómicas
LLC-99	46,XX,del(13)(q14)[15]/46,XX[5]	1 ó 2 anomalías cromosómicas	49	46,XX,del(13)(q14)[16]/46,XX[4]	1 ó 2 anomalías cromosómicas

Anexo 2: Tabla 2. Listado de los reordenamiento IGVH detectados en la serie completa y su estado mutacional.

Caso	Estado mutacional	Estado mutacional reordenamiento	Homología (%)	IGVH	IGDH	IGJH	CDR3	Productividad	Subset	ADNc
LLC-1	MUTADO	MUTADO	96,60	1-2	6-19	4	CAREDRGWYDIDDW	Sí		Sí
LLC-10	MUTADO	MUTADO	84,94	3-23	1-14	2	CAKHPIAGE#WYFDLW	No		No
		MUTADO	91,66	1-69	3-10	2	CARHFYEAALYGGYVSSYYFDLW	Sí		Sí
LLC-100	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-46	3-22	4	CARSYDSSGGYYSFDYW	Sí		Sí
LLC-11	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-73	2-2	6	CTRQEDYIVVPAAYSYYYGMDVW	Sí		Sí
LLC-12	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	4-31	3-22	6	CARSPPDGYDSSGGYIYGGYMDVW	Sí		Sí
LLC-121	MUTADO	MUTADO	94,04	4-34	6-19	3	CARDLAVPPDAFDVW	Sí		Sí
LLC-13	NO MUTADO	NO MUTADO	99,58	3-13	1-14	6	CARDPNRFTYDFWSGYNT#YYYYRMDVW	No		No
		NO MUTADO	100,00	1-69	2-21	6	CARDGGGTMVRGVIITLDYGGMDVW	Sí		Sí
LLC-14	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-11	3-9	6	CARSHFDWLLSYYGMDVW	Sí		Sí
LLC-15	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	4-34	2-8	4	CARWGN DYDFWSPVIDYW	Sí		Sí
LLC-16	MUTADO	MUTADO	85,22	4-61	3-22	6	CARSLFHPGGYSTDYPLDVW	Sí		Sí
LLC-17	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-8	3-3	6	CARGDLRFLWLSNYYGMDVW	Sí		Sí
LLC-18	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	4-17	4	CARDRGVIYDYFDYW	Sí		Sí
LLC-19	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	4-39	5-12	6	CARHRLGYCSSTSCYYYGMDVW	Sí		Sí
LLC-2	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-2	3-3	6	CARDGLRYDFWSGYSTSCYYYGMDVW	Sí		Sí
LLC-20	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-18	6-19	4	CARRQWLPLYFDYW	Sí	CLL#1	Sí
LLC-21	MUTADO	MUTADO	93,33	4-34	2-2	4	CARPAAYEYCSGTSCHYSFDYW	Sí		Sí
LLC-22	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-66	5-12	6	CATGYSGYGYGMDVW	Sí		Sí
LLC-23	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	2-2	6	CARVRPDIVVPAGIYGGYMDVW	Sí	CLL#3	Sí
LLC-24	MUTADO	MUTADO	96,97	6-1	1-7	6	CARHVGDPGIGTTDYYYGMDVW	Sí		Sí
LLC-25	MUTADO	MUTADO	94,79	3-21	2-15	6	CARDGNGMDVW	Sí		Sí
LLC-26	MUTADO	MUTADO	92,71	3-30-3	6-19	1	CARVLSGYTSGWPLRDW	Sí		Sí
LLC-27	NO MUTADO	NO MUTADO	99,65	5-51	2-15	6	CARHAAWVVVAATDPLYGGYMDVW	Sí		Sí
LLC-28	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	3-3	6	CARGSGFLEWLRLHNPYYGMDVW	Sí		Sí
LLC-29	MUTADO	MUTADO	93,05	3-7	2-2	4	CVRCVLTNLYWFDYW	Sí		Sí
LLC-3	MUTADO	MUTADO	96,18	4-39	6-19	4	CARGGAVAGTCSLLHFDHW	Sí		Sí
LLC-31	MUTADO	MUTADO	91,23	4-59	2-21	4	CARGGSNLRDLYFDYW	Sí		Sí
LLC-313	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-9	3-3	6	CARDDFWSGYPPYYGMDVW	Sí		Sí
LLC-33	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	4-4	2-2	6	CARVTRIVVPAAMTQPPYYGMDVW	Sí		Sí
LLC-34	MUTADO	MUTADO	86,23	1-2	5-24	4	CVRSASFALNHW	Sí		Sí
LLC-35	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	4-39	2-15	6	CANRPGYCSGGSCYDYYYGMDVW	Sí		Sí
		NO MUTADO	100,00	3-64	3-22	6	CVKFGGL**WLLLRG#YYYYGMDVW	No		No
LLC-36	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	3-16	3	CASLNPSMITFGGVIVHDGRDAFDIW	Sí		Sí
LLC-37	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	1-1	3	CAREHGASPYDFWSGYRGDAFDIW	Sí		Sí

Anexo 2: Tabla 2.(continuación) Listado de los reordenamiento IGVH detectados en la serie completa y su estado mutacional.

LLC-38	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-11	3-16	4	CARDLGFVLLPPRADW	Sí	Sí
LLC-39	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	3-3	6	CARAHPGHDDFWSGYPYQYLYYYYYYGM DWW	Sí	Sí
LLC-4	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	3-3	6	CARGRPDSDFWGSYISPLIYYYYGMDVW	Sí	Sí
LLC-40	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-46	3-22	3	CARVYYYDSSGYYKGVHDAFDIW	Sí	Sí
LLC-42	MUTADO	MUTADO	94,60	3-30	6-19	6	CARGLRKTSAWFAPENYDQYMDVW	Sí	Sí
LLC-43	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-11	3-16	4	CARVGPYDYVWGTPLYPSFDYW	Sí	Sí
LLC-44	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	2-5	3-22	6	-	Sí	Sí
		NO MUTADO	100,00	3-23	-	4	-	No	No
LLC-45	MUTADO	MUTADO	91,31	3-23	5-18	3	CAKDHSARGRPYAFDIW	Sí	Sí
LLC-46	NO MUTADO	NO MUTADO	99,70	4-34	6-19	2	CARGYWYFDLW	Sí	Sí
LLC-47	MUTADO	MUTADO	96,33	3-53	1-1	3	CAKFEQNAFDIW	Sí	Sí
LLC-48	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-33	3-3	5	CARDRLDSYDFWSVIGWFDPW	Sí	Sí
LLC-49	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	4-39	1-20	4	CARQRKGYYSSGPRPNYFDYW	Sí	Sí
LLC-5	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-30	3-3	6	CANARPTYDFWGSYRPSYYYYGMDVW	Sí	Sí
LLC-50	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-2	1-26	6	CARLYSGSYYYYYGMVW	Sí	CLL#28A Sí
LLC-51	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-30	3-3	6	CARDFLEWLLPQAYYYYYGMDVW	Sí	Sí
LLC-52	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	3-3	2	CARDNSITIFGVVIPTLSWFDLW	Sí	Sí
LLC-53	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	3-3	6	CARADYDFWGSYRGGWMDVW	Sí	Sí
LLC-54	MUTADO	MUTADO	86,97	4-30-2	3-3	4	-	Sí	Sí
LLC-55	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-18	3-9	4	CARDLPARDLRYFVGRGAELRYFDWFTPP FDYW	Sí	Sí
LLC-56	NO MUTADO	NO MUTADO	98,69	3-23	6-6	3	CAKAYSSSSGDAFDIW	Sí	Sí
LLC-57	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	2-2	6	CARDPRLGNIVVPAATSIAARPYYYGMD VW	Sí	Sí
LLC-58	NO MUTADO	NO MUTADO	99,51	3-9	6-6	4	CAKDITKLYSSSPFDYW	Sí	Sí
LLC-59	NO MUTADO	NO MUTADO	99,65	1-69	4-23	6	CARDSPLLTVTVDYYYYYMDVW	Sí	Sí
LLC-6	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-2	3-3	1	CARDGYLLLTGPTRIGAKYFQHW	Sí	Sí
LLC-60	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-11	6-19	1	CARAGYSSGWRLEYFQHW	Sí	Sí
LLC-61	MUTADO	MUTADO	95,95	3-21	-	6	CARDANGMDVW	Sí	CLL#2 Sí
LLC-62	NO MUTADO	MUTADO	96,13	1-8	-	6	CARDXXXXXXYYYYXXV	No	No
		NO MUTADO	100,00	3-33	3-22	4	CAREAPARTYSTYYYDSSGYSSAYFDYW	Sí	Sí
LLC-63	MUTADO	MUTADO	95,30	3-30	3-3	6	CVLVCERVMIFGVVIIPPSYCYMDVW	Sí	Sí
		MUTADO	96,90	4-34	3-10	4	-	No	No
LLC-64	NO MUTADO	NO MUTADO	99,55	1-69	3-9	4	CARENLDILTGWGLFDYW	Sí	Sí
LLC-65	MUTADO	MUTADO	87,09	3-48	2-2	6	CAKSTNSYPPFGMDVW	Sí	Sí
LLC-66	MUTADO	MUTADO	97,73	3-21	7-27	3	CARPGASANDAFDIW	Sí	Sí
LLC-67	MUTADO	MUTADO	89,80	4-34	3-22	4	CAREATGGVTFDYW	Sí	Sí

Anexo 2: Tabla 2.(continuación) Listado de los reordenamiento IGVH detectados en la serie completa y su estado mutacional.

LLC-68	NO MUTADO	NO MUTADO	98,98	4-4	3-16	3	CARQNHQHIYDIWGSTYGAFDIW	Sí	Sí
LLC-69	MUTADO	MUTADO	92,23	3-13	6-13	4	CAREAWSRGSWENVDFW	Sí	Sí
LLC-7	MUTADO	MUTADO	92,93	4-4	6-19	4	CARGPDSSGWRPWEYW	Sí	CLL#77 Sí
LLC-70	MUTADO	MUTADO	97,51	3-53	5-18	4	CARGQPMDYW	Sí	Sí
LLC-71	MUTADO	NO MUTADO	100,00	4-4	5-18	6	CASYSCPQFLSAMVL#YYYYYGMVDW	No	No
		MUTADO	96,18	3-74	6-13	4	CEAGAGTANW	Sí	Sí
LLC-72	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	3-3	6	CARAAGGITIFGVINYYYYYGMVDW	Sí	Sí
		NO MUTADO	100,00	4-34	5-24	4	CARGEMATI*L##	No	No
LLC-73	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	4-4	3-10	3	CARDVGLVYVYSGSYVYRGSDAFDIW	Sí	Sí
LLC-74	MUTADO	MUTADO	90,25	3-7	4-17	4	CARGKTTVTPGYFDCW	Sí	Sí
LLC-75	NO MUTADO	NO MUTADO	99,65	1-69	2-2	6	CARVGXDXXTSCYEGYXDXDXW	No	No
		NO MUTADO	99,65	3-9	4-17	6	CWGMAYGDYVADYYGMDVW	Sí	Sí
LLC-76	MUTADO	MUTADO	96,93	3-21	-	6	CARDQNGMDVW	Sí	CLL#2 Sí
LLC-77	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-18	3-22	4	CITVRENYFDYW	Sí	Sí
LLC-78	MUTADO	MUTADO	95,61	3-21	1-1	6	CARDANGMDVW	Sí	CLL#2 Sí
LLC-79	MUTADO	MUTADO	95,16	2-70	3-3	6	CARDPMEIDFWSGPGRYTSSSYGMDVW	Sí	Sí
LLC-8	NO MUTADO	NO MUTADO	99,65	1-3	2-21	4	CARSLRITYCGGDCYFDYW	Sí	Sí
LLC-80	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	2-2	6	CARPNCSTSCYSSYYGMDVW	Sí	Sí
LLC-81	MUTADO	MUTADO	96,36	4-59	1-7	4	CASDTYTSNYYYYW	Sí	Sí
LLC-82	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-7	2-2	6	CARVIGCSSTSCYEDYYYYYGMVDW	Sí	Sí
LLC-84	MUTADO	MUTADO	93,90	3-23	3-9	6	CAKDGDFGWYGGFYGMVDW	Sí	Sí
LLC-85	MUTADO	MUTADO	97,91	3-20	6-6	4	CATDSGVADQFDYW	Sí	Sí
LLC-86	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	3-16	3	CARGGVYDYVWGSYRPNDAFDIW	Sí	CLL#6 Sí
LLC-87	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-43	3-16	6	CAKDIAPPYDYVWGSKAKGYYYYYGMVDW	Sí	Sí
LLC-89	NO MUTADO	NO MUTADO	98,95	3-33	5-24	4	CARSVGYKTPPLDYW	Sí	Sí
LLC-9	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-69	1-20	6	CARTDLTIFGVVTNYYYYGMDVW	Sí	Sí
LLC-91	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-30	6-13	4	CAKDRYSSWYPRSDYW	Sí	Sí
LLC-92	NO MUTADO	NO MUTADO	98,68	3-21	6-19	4	CARDQEGTVAGIGDYW	Sí	Sí
LLC-93	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	1-18	3-10	6	CAREESYYGSGSYQSYGMDVW	Sí	Sí
LLC-94	NO MUTADO	NO MUTADO	99,30	3-11	3-22	4	CARGSSGYSGDAALW	Sí	Sí
LLC-95	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-33	5-24	6	CARDRDGYNWIFGGIRVSRYYYYGMDVW	Sí	Sí
LLC-96	NO MUTADO	NO MUTADO	100,00	3-23	3-16	4	CAKDGGVYDFWVSGYPPYFDYW	Sí	Sí
LLC-97	MUTADO	MUTADO	93,75	3-30	3-22	4	CVKDSWRQHDSSGSPFGFW	Sí	Sí
LLC-98	MUTADO	MUTADO	91,15	4-39	-	5	CARDFGPW	Sí	Sí
LLC-99	NO MUTADO	NO MUTADO	98,59	3-53	1-26	4	CARVRSGSYLDYW	Sí	Sí

Anexo 2: Tabla 3. Cobertura mínima y media alcanzada por región a estudio.

Gen	Exón	Número amplicones	Cobertura mínima	Cobertura media	Gen	Exón	Número amplicones	Cobertura mínima	Cobertura media	Gen	Exón	Número amplicones	Cobertura mínima	Cobertura media
TP53	1	1	3.431,00	3.852,00	1	1	290,00	322,00	36	2	2.800,00	2.828,50		
	2	1	5.469,00	6.910,00	2	1	581,00	663,50	37	3	4.264,00	4.477,00		
	3	1	4.592,00	4.743,00	3	2	3.955,00	4.509,00	38	1	578,00	653,00		
	4	4	28.447,00	28.483,50	4	2	1.844,00	2.102,50	39	3	6.241,00	6.525,00		
	5	2	8.571,00	11.353,00	5	2	1.433,00	1.684,00	40	1	1.072,00	1.073,00		
	6	2	4.895,00	6.154,00	6	2	1.938,00	2.203,00	42	2	3.440,00	3.755,00		
	7	2	12.523,00	13.121,00	7	3	5.075,00	5.599,50	43	3	3.919,00	4.141,00		
	8	2	10.082,50	12.891,00	8	2	2.996,00	3.173,50	44	2	2.990,00	3.393,00		
	9	1	7.633,00	8.001,00	9	2	935,00	1.012,00	45	2	6.076,00	6.231,00		
	10	2	12.469,00	13.598,50	10	4	5.362,00	6.115,00	46	3	2.982,00	3.761,50		
	11	1	2.588,00	3.018,50	11	3	3.637,00	3.923,50	47	2	1.179,00	1.410,50		
BIRC3	6	3	12.552,00	15.925,50	12	2	1.239,00	1.269,50	48	2	2.846,00	2.894,00		
	7	3	10.129,50	14.509,25	13	3	4.242,00	5.107,50	49	3	4.785,00	5.670,50		
	8	1	4.882,50	4.894,75	14	2	1.892,00	2.475,50	50	3	2.103,00	2.507,50		
	9	2	8.378,50	11.801,25	15	2	2.915,00	3.472,50	51	1	1.094,00	1.254,00		
NOTCH1	34	15	23.281,00	27.318,00	16	1	1.777,00	1.986,00	52	2	3.794,00	4.404,50		
MYD88	5	2	12.384,25	12.646,50	17	2	2.355,00	2.685,00	53	2	2.806,00	3.215,50		
SF3B1	14	3	7.051,50	7.808,75	18	3	3.839,00	4.683,00	54	1	350,00	501,50		
	15	2	9.111,00	9.703,00	19	1	749,00	750,50	55	2	5.238,00	5.754,00		
	16	2	3.430,50	5.096,50	20	2	1.168,00	1.329,50	56	1	563,00	701,00		
NFKBIE	1	8	20.451,00	21.591,00	21	1	165,00	198,50	57	2	1.478,00	1.487,50		
XPO1	14	1	16.285,00	16.597,00	22	2	1.770,00	2.169,50	58	2	1.497,00	1.608,50		
	15	2	23.328,00	23.659,50	23	2	2.810,00	3.455,00	59	1	1.056,00	1.193,00		
	16	2	20.512,00	20.761,00	24	3	2.991,00	3.828,00	60	2	1.440,00	1.785,00		
	1	1	214,00	287,00	25	2	3.558,00	4.199,50	61	1	2.168,00	2.540,00		
EGR2	2	13	63.248,00	66.785,50	26	3	3.730,00	4.674,50	62	4	4.443,00	5.802,50		
FBXW7	8	2	24.150,00	24.225,00	27	2	1.281,00	1.344,00						
	9	2	13.748,00	14.624,00	28	2	2.256,00	2.340,50						
	10	3	23.983,00	24.102,00	29	2	1.111,00	1.496,00						
	11	2	26.701,00	26.718,00	30	3	2.917,00	3.083,00						
	12	3	8.673,00	8.684,00	31	2	1.070,00	1.075,50						
PO1	6	2	23.551,00	23.572,00	32	2	1.660,00	2.180,00						
	7	2	8.189,00	10.620,00	33	1	478,00	567,00						
	8	4	42.398,00	42.711,50	34	2	1.371,00	1.774,00						
	9	2	26.181,00	26.689,00	35	2	2.608,00	2.703,00						

Anexo 2: Tabla 4 Variantes Benignas/probablemente benignas en el gen ATM, EGR2, FBXW7, NFKBIE, NOTCH1, POT1, TP53 y XPO1 detectadas por NGS en 93 casos sin tratar con LLC.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-33	chr11	108143456	22	C	G	ATM	c.3161C>G	p.Pro1054Arg	Missense	98.02	Clonal	COSM21827	rs1800057	Benigna
LLC-33	chr11	108138003	17	T	C	ATM	c.2572T>C	p.Phe858Leu	Missense	97.67	Clonal	COSM21826	rs1800056	Benigna
LLC-60	chr11	108160350	29	C	T	ATM	c.4258C>T	p.Leu1420Phe	Missense	89.73	Clonal	COSM6495410	rs1800058	Benigna
LLC-21	chr11	108121733	10	G	A	ATM	c.1541G>A	p.Gly514Asp	Missense	59.42	Clonal	COSM7356863	rs2235000	Benigna
LLC-92	chr11	108114727	6	G	C	ATM	c.544G>C	p.Val182Leu	Missense	54.58	Clonal	COSM9494827	rs3218707	Benigna
LLC-3	chr11	108143456	22	C	G	ATM	c.3161C>G	p.Pro1054Arg	Missense	54.31	Clonal	COSM21827	rs1800057	Benigna
LLC-74	chr11	108143456	22	C	G	ATM	c.3161C>G	p.Pro1054Arg	Missense	53.95	Clonal	COSM21827	rs1800057	Benigna
LLC-3	chr11	108138003	17	T	C	ATM	c.2572T>C	p.Phe858Leu	Missense	53.82	Clonal	COSM21826	rs1800056	Benigna
LLC-4	chr11	108138003	17	T	C	ATM	c.2572T>C	p.Phe858Leu	Missense	52.66	Clonal	COSM21826	rs1800056	Benigna
LLC-63	chr11	108123551	12	C	T	ATM	c.1810C>T	p.Pro604Ser	Missense	51.58	Clonal	COSM22499	rs2227922	Benigna
LLC-68	chr11	108121733	10	G	A	ATM	c.1541G>A	p.Gly514Asp	Missense	51.33	Clonal	COSM7356863	rs2235000	Benigna
LLC-79	chr11	108175462	37	G	A	ATM	c.5557G>A	p.Asp1853Asn	Missense	51.17	Clonal	COSM41596	rs1801516	Benigna
LLC-34	chr11	108175462	37	G	A	ATM	c.5557G>A	p.Asp1853Asn	Missense	50.68	Clonal	COSM41596	rs1801516	Benigna
LLC-65	chr11	108138003	17	T	C	ATM	c.2572T>C	p.Phe858Leu	Missense	50.46	Clonal	COSM21826	rs1800056	Benigna
LLC-66	chr11	108175462	37	G	A	ATM	c.5557G>A	p.Asp1853Asn	Missense	50.37	Clonal	COSM41596	rs1801516	Benigna
LLC-7	chr11	108224615	-/34	A	C	ATM	c.8786+8A>C	p.?	Splice site	50.15	Clonal	COSM6493990	rs4986839	Benigna
LLC-66	chr11	108188136	43	G	A	ATM	c.6235G>A	p.Val2079Ile	Missense	50.11	Clonal	COSM6493986	rs1800060	Benigna
LLC-4	chr11	108143456	22	C	G	ATM	c.3161C>G	p.Pro1054Arg	Missense	50.00	Clonal	COSM21827	rs1800057	Benigna
LLC-36	chr11	108224615	-/34	A	C	ATM	c.8786+8A>C	p.?	Splice site	49.46	Clonal	COSM6493990	rs4986839	Benigna
LLC-65	chr11	108143456	22	C	G	ATM	c.3161C>G	p.Pro1054Arg	Missense	49.41	Clonal	COSM21827	rs1800057	Benigna
LLC-68	chr11	108159732	28	C	T	ATM	c.4138C>T	p.His1380Tyr	Missense	49.31	Clonal	COSM24627	rs3092856	Benigna
LLC-21	chr11	108159732	28	C	T	ATM	c.4138C>T	p.His1380Tyr	Missense	48.84	Clonal	COSM24627	rs3092856	Benigna
LLC-65	chr11	108114792	6	C	T	ATM	c.609C>T	p.Asp203Asp	Sinónima	48.49	Clonal	COSM6495408	rs144709948	Probablemente benigna
LLC-22	chr11	108150209	-/22	GT	G	ATM	c.3285-9delT	p.?	Intrónica	48.20	Clonal	COSM5575302	rs1799757	Benigna
LLC-82	chr11	108143456	22	C	G	ATM	c.3161C>G	p.Pro1054Arg	Missense	47.77	Clonal	COSM21827	rs1800057	Benigna
LLC-35	chr11	108224615	-/34	A	C	ATM	c.8786+8A>C	p.?	Splice site	47.46	Clonal	COSM6493990	rs4986839	Benigna
LLC-28	chr11	108150209	-/22	GT	G	ATM	c.3285-9delT	p.?	Intrónica	47.30	Clonal	COSM5575302	rs1799757	Benigna
LLC-81	chr11	108224615	-/34	A	C	ATM	c.8786+8A>C	p.?	Splice site	47.29	Clonal	COSM6493990	rs4986839	Benigna
LLC-62	chr11	108175462	37	G	A	ATM	c.5557G>A	p.Asp1853Asn	Missense	47.01	Clonal	COSM41596	rs1801516	Benigna
LLC-24	chr11	108199973	-/23	G	T	ATM	c.7307+8G>T	p.?	Intrónica	34.06	Clonal			Probablemente benigna
LLC-2	chr11	108122583	11	A	C	ATM	c.1627A>C	p.Thr543Pro	Missense	13.23	Clonal			Probablemente benigna

Anotación basada en el transcrito NM_000051 (RefSeq).

Anexo 2: Tabla 4 (continuación) Variantes Benignas/probablemente benignas en el gen ATM, EGR2, FBXW7, NFKBIE, NOTCH1, POT1, TP53 y XPO1 detectadas por NGS en 93 casos sin tratar con LLC.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADnc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-42	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.92	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-53	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.91	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-77	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.85	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-2	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.76	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-59	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.76	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-38	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.75	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-40	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.75	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-75	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.75	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-1	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.71	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-29	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.67	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-39	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.67	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-63	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.67	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-33	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.66	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-37	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.65	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-66	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.65	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-21	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.64	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-28	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.64	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-9	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.63	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-69	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.60	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-50	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.59	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-52	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.59	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-55	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.59	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-23	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.57	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-93	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.36	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-31	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.32	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-34	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.30	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-19	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.15	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-43	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.05	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-22	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.03	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-20	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.02	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-12	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.01	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-46	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	99.00	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-54	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.83	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-78	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.80	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-27	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.79	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-10	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.75	Clonal		rs224083	Benigna

Anexo 2: Tabla 4 (continuación) Variantes Benignas/probablemente benignas en el gen ATM, EGR2, FBXW7, NFKBIE, NOTCH1, POT1, TP53 y XPO1 detectadas por NGS en 93 casos sin tratar con LLC.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-18	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.73	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-16	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.72	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-17	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.72	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-45	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.72	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-95	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.72	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-57	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.70	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-62	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.68	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-13	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.61	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-14	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.61	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-11	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.60	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-73	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.59	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-24	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.40	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-15	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.13	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-26	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.12	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-97	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	98.10	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-99	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	97.84	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-3	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	96.99	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-313	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	93.17	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-5	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	93.11	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-94	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	92.98	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-7	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	92.97	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-8	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	92.79	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-121	chr10	64573771	2	C	T	EGR2	c.627G>A	p.Pro209Pro	Sinónima	91.90	Clonal		rs224083	Benigna
LLC-59	chr10	64573312	2	T	G	EGR2	c.1086A>C	p.Arg362Arg	Sinónima	49.74	Clonal	COSM4415767	rs45602133	Benigna

Anotación basada en el transcrito NM_000399 (RefSeq).

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-93	chr4	153250860	8	G	A	FBXW7	c.1200C>T	p.Asp400Asp	Sinónima	48.39	Clonal	COSM51401		Benigna

Anotación basada en el transcrito NM_033632 (RefSeq).

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-19	chr6	44233251	1	A	G	NFKBIE	c.250T>C	p.Leu84Leu	Sinónima	71.77	Clonal			Benigna
LLC-73	chr6	44233251	1	A	G	NFKBIE	c.250T>C	p.Leu84Leu	Sinónima	54.59	Clonal			Benigna
LLC-19	chr6	44233216	1	G	C	NFKBIE	c.285C>G	p.His95Gln	Missense	52.55	Clonal		rs28362857	Probablemente benigna
LLC-86	chr6	44233216	1	G	C	NFKBIE	c.285C>G	p.His95Gln	Missense	51.86	Clonal		rs28362857	Probablemente benigna
LLC-73	chr6	44233216	1	G	C	NFKBIE	c.285C>G	p.His95Gln	Missense	51.52	Clonal		rs28362857	Probablemente benigna

Anexo 2: Tabla 4 (continuación) Variantes Benignas/probablemente benignas en el gen ATM, EGR2, FBXW7, NFKBIE, NOTCH1, POT1, TP53 y XPO1 detectadas por NGS en 93 casos sin tratar con LLC.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-81	chr6	44233216	1	G	C	NFKBIE	c.285C>G	p.His95Gln	Missense	51.34	Clonal		rs28362857	Probablemente benigna
LLC-38	chr6	44233372	1	G	C	NFKBIE	c.129C>G	p.Gly43Gly	Sinónima	51.14	Clonal	COSM9159234		Benigna
LLC-78	chr6	44233251	1	A	G	NFKBIE	c.250T>C	p.Leu84Leu	Sinónima	48.51	Clonal			Benigna
LLC-66	chr6	44232920	1	A	G	NFKBIE	c.524T>C	p.Val194Ala	Missense	47.83	Clonal	COSM4998033	rs2233434	Probablemente benigna
LLC-66	chr6	44232977	1	G	A	NFKBIE	c.524C>T	p.Pro36Leu	Missense	46.83	Clonal	COSM5432864	rs2233433	Probablemente benigna
LLC-45	chr6	44232920	1	A	G	NFKBIE	c.581T>C	p.Val194Ala	Missense	46.34	Clonal	COSM4998033	rs2233434	Probablemente benigna
LLC-78	chr6	44232920	1	A	G	NFKBIE	c.581T>C	p.Val194Ala	Missense	45.38	Clonal	COSM4998033	rs2233434	Probablemente benigna
LLC-11	chr6	44232920	1	A	G	NFKBIE	c.581T>C	p.Val194Ala	Missense	45.27	Clonal	COSM4998033	rs2233434	Probablemente benigna
LLC-15	chr6	44232920	1	A	G	NFKBIE	c.581T>C	p.Val194Ala	Missense	41.90	Clonal	COSM4998033	rs2233434	Probablemente benigna
LLC-57	chr6	44233251	1	A	G	NFKBIE	c.250T>C	p.Leu84Leu	Sinónima	28.00	Clonal			Benigna
LLC-43	chr6	44233251	1	A	G	NFKBIE	c.250T>C	p.Leu84Leu	Sinónima	15.06	Clonal			Benigna

Anotación basada en el transcrito NM_004556 (RefSeq).

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-23	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	100.00	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-40	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.84	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-3	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.79	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-5	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.79	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-43	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.75	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-50	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.71	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-13	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.69	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-38	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.69	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-89	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.68	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-45	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.67	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-37	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.61	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-33	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.60	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-14	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.57	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-20	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.57	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-31	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.56	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-9	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.55	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-121	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.49	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-46	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.48	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-21	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	99.19	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-44	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	98.80	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-59	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	98.51	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-53	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	98.18	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna

Anexo 2: Tabla 4 (continuación) Variantes Benignas/probablemente benignas en el gen ATM, EGR2, FBXW7, NFKBIE, NOTCH1, POT1, TP53 y XPO1 detectadas por NGS en 93 casos sin tratar con LLC.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNC	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-56	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	97.69	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-25	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	95.75	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-2	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	57.89	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-29	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	53.44	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-313	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	53.21	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-78	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	53.10	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-84	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	53.10	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-16	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	53.07	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-11	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	52.41	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-1	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	52.30	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-92	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	52.29	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-31	chr9	139391338	34	C	T	NOTCH1	c.6853G>A	p.Val2285Ile	Missense	51.94	Clonal	COSM41579	rs61751489	Benigna
LLC-8	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	51.79	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-31	chr9	139391555	34	G	A	NOTCH1	c.6636C>T	p.Asp2212Asp	Sinónima	51.73	Clonal	COSM4588628	rs370606059	Probablemente benigna
LLC-75	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	51.37	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-77	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	51.34	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-18	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	51.30	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-24	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	51.20	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-27	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	51.08	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-19	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	50.59	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-34	chr9	139390517	34	C	T	NOTCH1	c.*6G>A	p.?	3pUTR	50.37	Clonal	COSN8296731	rs73668310	Benigna
LLC-94	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	50.26	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-15	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	49.65	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-10	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	49.60	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-51	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	49.30	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-55	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	48.88	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-34	chr9	139390958	34	T	C	NOTCH1	c.7233A>G	p.Pro2411Pro	Sinónima	48.08	Clonal	COSM33756	rs11574911	Benigna
LLC-49	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	47.92	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-48	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	46.28	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-54	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	45.58	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-39	chr9	139391636	34	G	A	NOTCH1	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	Sinónima	39.61	Clonal	COSM3763781	rs2229974	Benigna
LLC-44	chr9	139390879	34	G	C	NOTCH1	c.7312C>G	p.Pro2438Ala	Missense	32.11	Clonal			Probablemente benigna
LLC-19	chr9	139390716	34	G	A	NOTCH1	c.7475C>T	p.Ser2492Leu	Missense	1.22	Subclonal bajo	COSM9360387	rs751367016	Probablemente benigna

Anexo 2: Tabla 4 (continuación) Variantes Benignas/probablemente benignas en el gen ATM, EGR2, FBXW7, NFKBIE, NOTCH1, POT1, TP53 y XPO1 detectadas por NGS en 93 casos sin tratar con LLC.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-27	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	99.77	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-43	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	99.64	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-11	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	99.62	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-75	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	99.60	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-42	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	99.54	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-73	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	99.50	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-54	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	99.49	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-59	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	99.48	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-14	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	99.35	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-2	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	99.31	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-3	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	56.67	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-40	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	55.46	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-50	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	54.22	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-28	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	53.98	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-22	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	53.82	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-95	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	53.26	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-29	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	51.73	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-69	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	51.65	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-57	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	51.32	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-78	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	51.25	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-77	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	50.94	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-99	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	50.72	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-52	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	50.68	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-63	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	50.38	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-55	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	50.35	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-39	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	50.28	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-53	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	50.02	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-38	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	49.91	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-19	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	49.85	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-20	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	49.85	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-24	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	49.52	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-31	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	49.25	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-15	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	48.40	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-16	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	48.40	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-17	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	48.40	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna

Anexo 2: Tabla 4(continuación) Variantes Benignas/probablemente benignas en el gen ATM, EGR2, FBXW7, NFKBIE, NOTCH1, POT1, TP53 y XPO1 detectadas por NGS en 93 casos sin tratar con LLC.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-23	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	48.37	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-21	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	46.81	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna
LLC-58	chr7	124499003	-/9	T	A	POT1	c.702+8A>T	p.?	Intrónica	45.41	Clonal	COSM6353988	rs6959712	Benigna

Anotación basada en el transcrito NM_015450 (RefSeq).

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-121	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	100.00	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-13	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	100.00	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-14	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	100.00	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-16	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	100.00	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-33	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	100.00	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-50	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	100.00	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-58	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	100.00	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-67	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	100.00	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-69	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	100.00	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-73	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	100.00	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-91	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	100.00	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-97	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	100.00	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-12	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	99.91	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-24	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	99.87	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-55	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	99.87	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-29	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	99.70	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-77	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	99.49	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-42	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	99.45	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-84	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	99.10	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-9	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	98.18	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-17	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	97.54	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-62	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	97.18	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-1	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	97.16	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-54	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	95.28	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-56	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	60.50	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-95	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	56.09	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-21	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	55.92	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-10	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	55.52	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-5	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	54.87	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-25	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	54.03	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna

Anexo 2: Tabla 4 (continuación) Variantes Benignas/probablemente benignas en el gen ATM, EGR2, FBXW7, NFKBIE, NOTCH1, POT1, TP53 y XPO1 detectadas por NGS en 93 casos sin tratar con LLC.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-31	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	54.02	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-43	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	53.55	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-60	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	53.21	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-36	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	53.19	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-47	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	53.16	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-51	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	53.13	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-78	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	53.04	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-15	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	52.22	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-35	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	47.99	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-49	chr17	7579472	4	G	C	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	Missense	46.37	Clonal	COSM250061	rs1042522	Benigna
LLC-33	chr17	7578210	6	T	C	TP53	c.639A>G	p.Arg213Arg	Sinónima	43.84	Clonal		rs1800372	Benigna
LLC-35	chr17	7578210	6	T	C	TP53	c.639A>G	p.Arg213Arg	Sinónima	43.00	Clonal		rs1800372	Benigna

Anotación basada en el transcrito NM_000546 (RefSeq).

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-77	chr2	61719275	16	T	C	XPO1	c.1782A>G	p.Lys594Lys	Sinónima	66.32	Clonal		rs3816341	Benigna

Anotación basada en el transcrito NM_003400 (RefSeq).

Anexo 2: Tabla 5 Variantes patogénicas/probablemente patogénicas y de significado incierto en el gen ATM, BIRC3, EGR2, FBXW7, MYD88, NKFBIE, NOTCH1, POT1, SF3B1, TP53 y XPO1 detectadas por NGS en 93 casos sin tratar con LLC.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-33	chr11	108199963	49	C	A	ATM	c.7305C>A	p.Asn2435Lys	Missense	95.80	Clonal	COSM5008208	rs1160508407	Significado incierto
LLC-36	chr11	108165786	32	G	T	ATM	c.4909G>T	p.Asp1637Tyr	Missense	51.89	Clonal	COSM6927787	rs753870656	Significado incierto
LLC-80	chr11	108175400	-	A	C	ATM	c.5497-2A>C	p.?	Splice site	50.44	Clonal		rs786203796	Probablemente patogénica
LLC-62	chr11	108235906	62	C	T	ATM	c.8948C>T	p.Thr2983Ile	Missense	47.55	Clonal			Significado incierto
LLC-1	chr11	108175549	37	C	T	ATM	c.5644C>T	p.Arg1882*	Nonsense	46.66	Clonal	COSM6853936	rs786204433	Patogénica
LLC-121	chr11	108139233	18	A	T	ATM	c.2735A>T	p.Gln912Leu	Missense	42.13	Clonal		rs730881353	Significado incierto
LLC-92	chr11	108216611	58	C	T	ATM	c.8560C>T	p.Arg2854Cys	Missense	40.89	Clonal	COSM6606832	rs201958469	Significado incierto
LLC-80	chr11	108190786		G	A	ATM	c.6452+1G>A	p.?	Splice site	38.48	Clonal	COSM6196727		Probablemente patogénica
LLC-79	chr11	108236183	63	T	C	ATM	c.9119T>C	p.Ile3040Thr	Missense	32.60	Clonal			Significado incierto
LLC-92	chr11	108190786	-	G	A	ATM	c.6452+1G>A	p.?	Splice site	23.30	Clonal	COSM6196727		Probablemente patogénica
LLC-36	chr11	108127068	14	G	T	ATM	c.2250+1G>T	p.?	Splice site	16.14	Clonal	COSM4953395		Significado incierto
LLC-61	chr11	108124723	13	T	C	ATM	c.2081T>C	p.Leu694Pro	Missense	13.07	Clonal			Significado incierto
LLC-60	chr11	108163399	30	T	A	ATM	c.4490T>A	p.Leu1497Ter	Nonsense	10.00	Clonal			Significado incierto

Anotación basada en el transcrito NM_000051 (RefSeq).

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-58	chr10	64573167	2	C	A	EGR2	c.1231G>T	p.Asp411Tyr	Missense	98.45	Clonal	COSM5574599		Patogénica
LLC-15	chr10	64573332	2	C	T	EGR2	c.1066G>A	p.Glu356Lys	Missense	64.07	Clonal	COSM145364	rs751448371	Patogénica
LLC-17	chr10	64573332	2	C	T	EGR2	c.1066G>A	p.Glu356Lys	Missense	43.39	Clonal	COSM145364	rs751448371	Patogénica
LLC-69	chr10	64574231	-/1	T	A	EGR2	c.170-3A>T	p.?	Splice site	35.00	Clonal			Significado incierto
LLC-3	chr10	64573332	2	C	T	EGR2	c.1066G>A	p.Glu356Lys	Missense	10.41	Clonal	COSM145364	rs751448371	Patogénica
LLC-57	chr10	64573167	2	C	A	EGR2	c.1231G>T	p.Asp411Tyr	Missense	5.97	Subclonal alto	COSM5574599		Patogénica

Anotación basada en el transcrito NM_000399 (RefSeq). Línea de puntos divide las variantes con VAF clonal y subclonal.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-36	chr4	153247168	10	T	C	FBXW7	c.1634A>G	p.Tyr545Cys	Missense	24.49	Clonal	COSM22989	rs1560758208	Probablemente patogénica
LLC-14	chr4	153247288	10	C	A	FBXW7	c.1514G>T	p.Arg505Leu	Missense	21.75	Clonal	COSM23000	rs1057519896	Probablemente patogénica
LLC-93	chr4	153249459	9	T	A	FBXW7	c.1319A>T	p.Asp440Val	Missense	13.55	Clonal	COSM5748786		Probablemente patogénica
LLC-97	chr4	153247288	10	C	A	FBXW7	c.1514G>T	p.Arg505Leu	Missense	1.93	Subclonal bajo	COSM23000	rs1057519896	Probablemente patogénica
LLC-28	chr4	153249463	9	T	C	FBXW7	c.1315A>G	p.Thr439Ala	Missense	1.01	Subclonal bajo	COSM6492335		Probablemente patogénica

Anotación basada en el transcrito NM_033632 (RefSeq). Línea de puntos divide las variantes con VAF clonal y subclonal.

Anexo 2: Tabla 5 (continuación) Variantes patogénicas/probablemente patogénicas y de significado incierto en el gen ATM, BIRC3, EGR2, FBXW7, MYD88, NFKBIE, NOTCH1, POT1, SF3B1, TP53 y XPO1 detectadas por NGS en 93 casos sin tratar con LLC.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-99	chr3	38182641	5	T	C	MYD88	c.818T>C	p.Leu273Pro	Missense	47.15	Clonal	COSM85940		Patogénica
LLC-24	chr3	38182641	5	T	C	MYD88	c.818T>C	p.Leu273Pro	Missense	42.61	Clonal	COSM85940		Patogénica

Anotación basada en el transcrito NM_002468 (RefSeq).

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-2	chr6	44232739	1	GTAAG	G	NFKBIE	c.758_761delCTTA	p.Tyr254fs*13	Frameshift Indel	11.46	Clonal			Significado incierto
LLC-59	chr6	44232739	1	GTAAG	G	NFKBIE	c.758_761delCTTA	p.Tyr254fs*13	Frameshift Indel	1.40	Subclonal bajo			Significado incierto

Anotación basada en el transcrito NM_004556 (RefSeq). Línea de puntos divide las variantes con VAF clonal y subclonal.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-39	chr9	139390648	34	CAG	C	NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	60.99	Clonal	COSM12774	rs763016003	Significado incierto
LLC-313	chr9	139390648	34	CAG	C	NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	53.51	Clonal	COSM12774	rs763016003	Significado incierto
LLC-37	chr9	139390945	34	G	A	NOTCH1	c.7246C>T	p.Gln2416*	Nonsense	44.05	Clonal	COSM27387	rs1564567815	Probablemente patogénica
LLC-27	chr9	139390648	34	CAG	C	NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	43.54	Clonal	COSM12774	rs763016003	Significado incierto
LLC-19	chr9	139390648	34	CAG	C	NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	39.30	Clonal	COSM12774	rs763016003	Significado incierto
LLC-49	chr9	139390648	34	CAG	C	NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	31.17	Clonal	COSM12774	rs763016003	Significado incierto
LLC-84	chr9	139390648	34	CAG	C	NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	31.17	Clonal	COSM12774	rs763016003	Significado incierto
LLC-74	chr9	139390981	34	G	A	NOTCH1	c.7210C>T	p.Gln2404*	Nonsense	28.90	Clonal	COSM4745910	rs1554826400	Significado incierto
LLC-40	chr9	139390648	34	CAG	C	NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	18.74	Clonal	COSM12774	rs763016003	Significado incierto
LLC-97	chr9	139390648	34	CAG	C	NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	17.06	Clonal	COSM12774	rs763016003	Significado incierto
LLC-2	chr9	139390648	34	CAG	C	NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	15.07	Clonal	COSM12774	rs763016003	Significado incierto
LLC-89	chr9	139390648	34	CAG	C	NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	13.06	Clonal	COSM12774	rs763016003	Significado incierto
LLC-61	chr9	139391977	34	C	T	NOTCH1	c.6214G>A	p.Gly2072Ser	Missense	12.80	Clonal			Probablemente patogénica

Anotación basada en el transcrito NM_017617 (RefSeq).

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-91	chr7	124532409	6	G	GTA	POT1	c.34_35insTA	p.Thr12fs*4	Frameshift Indel	34.16	Clonal			Probablemente patogénica
LLC-78	chr7	124499024	9	G	A	POT1	c.689C>T	p.Ala230Val	Missense	2.58	Subclonal bajo			Probablemente patogénica

Anotación basada en el transcrito NM_015450 (RefSeq). Línea de puntos divide las variantes con VAF clonal y subclonal.

Anexo 2: Tabla 5 (continuación) Variantes patogénicas/probablemente patogénicas y de significado incierto en el gen ATM, BIRC3, EGR2, FBXW7, MYD88, NKFBIE, NOTCH1, POT1, SF3B1, TP53 y XPO1 detectadas por NGS en 93 casos sin tratar con LLC.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-63	chr2	198266854	15	C	T	SF3B1	c.2078G>A	p.Gly693Asp	Missense	51.24	Clonal	COSM7083563		Probablemente patogénica
LLC-11	chr2	198266611	16	C	T	SF3B1	c.2225G>A	p.Gly742Asp	Missense	49.00	Clonal	COSM145923	rs755415626	Probablemente patogénica
LLC-53	chr2	198267369	14	G	A	SF3B1	c.1988C>T	p.Thr663Ile	Missense	45.65	Clonal	COSM145921	rs1239341681	Probablemente patogénica
LLC-86	chr2	198267481	14	T	A	SF3B1	c.1876A>T	p.Asn626Tyr	Missense	45.09	Clonal	COSM145920		Probablemente patogénica
LLC-14	chr2	198266822	15	T	A	SF3B1	c.2110A>T	p.Ile704Phe	Missense	20.10	Clonal	COSM1159840		Probablemente patogénica
LLC-70	chr2	198266713	15	C	T	SF3B1	c.2219G>A	p.Gly740Glu	Missense	36.95	Clonal	COSM133120	rs776846119	Probablemente patogénica
LLC-66	chr2	198266834	15	T	C	SF3B1	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	33.12	Clonal	COSM84677	rs559063155	Probablemente patogénica
LLC-56	chr2	198266834	15	T	C	SF3B1	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	12.86	Clonal	COSM84677	rs559063155	Probablemente patogénica
LLC-50	chr2	198267369	14	G	A	SF3B1	c.1988C>T	p.Thr663Ile	Missense	11.35	Clonal	COSM145921	rs1239341681	Probablemente patogénica
LLC-97	chr2	198266611	16	C	T	SF3B1	c.2225G>A	p.Gly742Asp	Missense	8.24	Subclonal alto	COSM145923	rs755415626	Probablemente patogénica
LLC-37	chr2	198267361	14	T	C	SF3B1	c.1996A>G	p.Lys666Glu	Missense	5.92	Subclonal alto	COSM110694	rs754688962	Probablemente patogénica
LLC-37	chr2	198266834	15	T	C	SF3B1	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	4.95	Subclonal bajo	COSM84677	rs559063155	Probablemente patogénica
LLC-56	chr2	198266713	15	C	T	SF3B1	c.2219G>A	p.Gly740Glu	Missense	3.81	Subclonal bajo	COSM133120	rs776846119	Probablemente patogénica
LLC-97	chr2	198266834	15	T	C	SF3B1	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	3.13	Subclonal bajo	COSM84677	rs559063155	Probablemente patogénica
LLC-18	chr2	198267491	14	C	G	SF3B1	c.1866G>C	p.Glu622Asp	Missense	1.12	Subclonal bajo	COSM132938	rs763149798	Probablemente patogénica
LLC-42	chr2	198266834	15	T	C	SF3B1	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	1.03	Subclonal bajo	COSM84677	rs559063155	Probablemente patogénica
LLC-81	chr2	198266834	15	T	C	SF3B1	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	1.03	Subclonal bajo	COSM84677	rs559063155	Probablemente patogénica
LLC-46	chr2	198267361	14	T	C	SF3B1	c.1996A>G	p.Lys666Glu	Missense	1.01	Subclonal bajo	COSM110694	rs754688962	Probablemente patogénica

Anotación basada en el transcrito NM_012433 (RefSeq). Línea de puntos divide las variantes con VAF clonal y subclonal.

Anexo 2: Tabla 5 (continuación) Variantes patológicas/probablemente patológicas y de significado incierto en el gen ATM, BIRC3, EGR2, FBXW7, MYD88, NFKBIE, NOTCH1, POT1, SF3B1, TP53 y XPO1 detectadas por NGS en 93 casos.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	Significación Clínica
LLC-39	chr17	7578474	5	CGGGGGT	C	TP53	c.450_455delCCCCCA	p.Pro150fs*	Frameshift Indel	96.71	Clonal		Patogénica
LLC-91	chr17	7578212	6	G	A	TP53	c.637C>T	p.Arg213*	Nonsense	80.58	Clonal	COSM10654	Patogénica
LLC-51	chr17	7578454	5	G	A	TP53	c.476C>T	p.Ala159Val	Missense	72.53	Clonal	COSM11148	Probablemente patogénica
LLC-24	chr17	7579575	4	G	A	TP53	c.112C>T	p.Gln38*	Nonsense	42.24	Clonal	COSM46286	Patogénica
LLC-11	chr17	7577538	7	C	T	TP53	c.743G>A	p.Arg248Gln	Missense	39.58	Clonal	COSM10662	Patogénica
LLC-86	chr17	7577538	7	C	T	TP53	c.743G>A	p.Arg248Gln	Missense	29.12	Clonal	COSM10662	Patogénica
LLC-15	chr17	7579436	3	GC	G	TP53	c.250delG	p.Arg84fs*39	Frameshift Indel	26.53	Clonal	COSM674147	Patogénica
LLC-49	chr17	7577580	7	T	C	TP53	c.701A>G	p.Tyr234Cys	Missense	23.93	Clonal	COSM10725	Patogénica
LLC-92	chr17	7578403	5	C	G	TP53	c.527G>C	p.Cys176Ser	Missense	18.18	Clonal	COSM44645	Patogénica
LLC-35	chr17	7578506	5	GGCAGGTC	G	TP53	c.417_423delCGTCCAG	p.Lys139fs*29	Frameshift Indel	16.55	Clonal		Patogénica
LLC-2	chr17	7578190	6	T	C	TP53	c.659A>G	p.Tyr220Cys	Missense	7.79	Subclonal alto	COSM10758	Patogénica
LLC-40	chr17	7577093	8	C	T	TP53	c.845G>A	p.Arg282Gln	Missense	7.45	Subclonal alto	COSM44338	Probablemente patogénica
LLC-77	chr17	7577518	7	T	A	TP53	c.763A>T	p.Ile255Phe	Missense	6.74	Subclonal alto	COSM43651	Probablemente patogénica
LLC-49	chr17	7578265	6	A	G	TP53	c.584T>C	p.Ile195Thr	Missense	6.20	Subclonal alto	COSM11089	Patogénica
LLC-49	chr17	7574003	10	G	A	TP53	c.1024C>T	p.Arg342*	Nonsense	4.29	Subclonal bajo	COSM11073	Patogénica
LLC-51	chr17	7577545	7	T	C	TP53	c.736A>G	p.Met246Val	Missense	3.46	Subclonal bajo	COSM43555	Patogénica
LLC-11	chr17	7578280	6	G	A	TP53	c.569C>T	p.Pro190Leu	Missense	2.27	Subclonal bajo	COSM43657	Probablemente patogénica
LLC-49	chr17	7577121	8	G	A	TP53	c.817C>T	p.Arg273Cys	Missense	1.13	Subclonal bajo	COSM10659	Patogénica
LLC-121	chr17	7578541	5	A	G	TP53	c.389T>C	p.Leu130Pro	Missense	1.10	Subclonal bajo	COSM45481	Patogénica

Anotación basada en el transcrito NM_000546 (RefSeq). Línea de puntos divide las variantes con VAF clonal y subclonal.

Caso	Cromosoma	Posición genómica (hg19)	Exón/Intrón	Ref	Var	Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Frecuencia alélica Variante (VAF%)	Clonalidad VAF>10%	COSMIC	rsdb	Significación Clínica
LLC-40	chr2	61719471	15	T	A	XPO1	c.1712A>T	p.Glu571Val	Missense	55.16	Clonal	COSM146109	rs1057520010	Probablemente patogénica
LLC-81	chr2	61719472	15	C	T	XPO1	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	47.16	Clonal	COSM96797	rs1057520009	Probablemente patogénica
LLC-5	chr2	61719472	15	C	T	XPO1	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	39.81	Clonal	COSM96797	rs1057520009	Probablemente patogénica
LLC-59	chr2	61719472	15	C	T	XPO1	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	39.31	Clonal	COSM96797	rs1057520009	Probablemente patogénica
LLC-62	chr2	61719472	15	C	T	XPO1	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	33.50	Clonal	COSM96797	rs1057520009	Probablemente patogénica
LLC-73	chr2	61719472	15	C	T	XPO1	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	26.60	Clonal	COSM96797	rs1057520009	Probablemente patogénica
LLC-2	chr2	61719471	15	T	A	XPO1	c.1712A>T	p.Glu571Val	Missense	15.44	Clonal	COSM146109	rs1057520010	Probablemente patogénica
LLC-11	chr2	61719472	15	C	T	XPO1	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	7.06	Subclonal alto	COSM96797	rs1057520009	Probablemente patogénica
LLC-62	chr2	61719321	16	C	A	XPO1	c.1736G>T	p.Gly579Val	Missense	6.74	Subclonal alto	COSM7206173		Probablemente patogénica
LLC-11	chr2	61719186	16	T	C	XPO1	c.1871A>G	p.Asp624Gly	Missense	5.41	Subclonal alto	COSM1291525		Probablemente patogénica
LLC-28	chr2	61719186	16	T	C	XPO1	c.1871A>G	p.Asp624Gly	Missense	5.32	Subclonal alto	COSM1291525		Probablemente patogénica
LLC-59	chr2	61719527	15	GG	G	XPO1	c.1655delC	p.Pro552fs*4	Frameshift Indel	1.19	Subclonal bajo			Probablemente patogénica
LLC-33	chr2	61719472	15	C	T	XPO1	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	1.05	Subclonal bajo	COSM96797	rs1057520009	Probablemente patogénica

Anotación basada en el transcrito NM_003400 (RefSeq). Línea de puntos divide las variantes con VAF clonal y subclonal.

Anexo 2: Tabla 6 Tabla de asociación entre el perfil mutacional, y las variantes clínicas y biológicas.

		MYD88 (n=2)		NOTCH1 (n=12)		SF3B1 (n=15)		BIRC3 (n=3)		TP53 (n=14)		XPO1 (n=10)		POT1 (n=2)		EGR2 (n=6)		NFKBIE (n=2)		FBXW (n=5)	
		n	p-valor	n	p-valor	n	p-valor	n	p-valor	n	p-valor	n	p-valor	n	p-valor	n	p-valor	n	p-valor	n	p-valor
Estado mutacional IGVH	No mutado (61, 68,53%)	1		9		9		3		12		9		2		4		2		4	
	Mutado (29, 31,46%)	1	0.53	3	0.44	5	0.46	0	0.31	2	0.05	1	0.11	0	0.46	2	0.61	0	0.46	1	0.49
Edad>65 años	No (53, 59,55%)	2		5		11		1		6		8		1		6		1		2	
	Sí (36, 40,45%)	0	0.35	7	0.14	3	0.098	2	0.35	6	0.34	2	0.14	1	0.65	0	0.04	1	0.65	3	0.32
Sexo	Hombre (57, 61%)	1		12		7		3		8		7		1		0		2		4	
	Mujer (36, 39%)	1	0.62	1	0.01	8	0.16	0	0.22	6	0.47	3	0.4	1	0.62	6	0.003	0	0.37	1	0.35
Estadio Binet, n (%)	A (29, 35,58%)	0		5		5		1		4		4		0		2		2		1	
	B+C (60, 67,41%)	2	0.45	7	0.34	9	0.5	2	0.69	8	0.59	6	0.41	2	0.45	4	0.64	0	0.1	4	0.47
ECOG, n (%)	0 (76, 84,44%)	1		10		12		1		11		8		2		6		2		4	
	>0 (14, 15,55%)	1	0.28	3	0.32	3	0.42	2	0.06	2	0.67	2	0.48	0	0.71	0	0.35	0	0.71	1	0.58
LDH elevado, n (%)	No (66, 74,15%)	1		7		9		0		11		7		1		6		0		3	
	Sí (23, 25,84%)	1	0.45	5	0.16	5	0.27	3	0.016	3	0.48	3	0.5	0	0.74	0	0.15	2	0.06	2	0.38
del(13q14)	No (51, 57,30%)	0		6		12		2		4		5		1		1		1		3	
	Sí (38, 42,69%)	2	0.18	6	0.4	2	0.017	1	0.61	8	0.069	5	0.43	1	0.67	5	0.049	1	0.67	2	0.64
Trisomía 12	No (72, 80,89%)	2		10		12		2		11		9		1		5		1		4	
	Sí (17, 19,10%)	0	0.65	2	0.56	2	0.47	1	0.47	1	0.28	1	0.39	1	0.35	1	0.67	1	0.35	1	0.66
del(11q22)	No (76, 85,39%)	2		10		12		2		11		8		2		5		1		5	
	Sí (13, 14,60%)	0	0.72	2	0.55	2	0.66	1	0.38	1	0.44	2	0.45	0	0.72	1	0.62	1	0.27	0	0.45
del(17p13)	No (81, 91,01%)	2		9		13		3		8		10		2		5		2		4	
	Sí (8, 8,98%)	0	0.83	3	0.07	1	0.63	0	0.75	4	0.01	0	0.37	0	0.82	1	0.44	0	0.83	1	0.38
Grupo de riesgo	Bajo (17, 19,10%)	0		2		4		0		0		1		0		2		0		0	
	Intermedio-Alto-MuyAlto (72, 80,89%)	2	0.65	10	0.58	10	0.26	3	0.52	12	0.065	9	0.39	2	0.65	4	0.32	2	0.65	5	0.33
Número de mutaciones	0-1 (67, 72%)	1		5		8		0		2		1		1		5		0		1	
	≥ 2 (26, 28%)	1	0.48	8	<0.01	7	0.07	3	0.02	12	<0.001	9	<0.001	1	0.48	1	0.46	2	0.07	4	0.02

Anexo 2: Tabla 7 Resumen de las variantes patogénicas detectadas en los pacientes estudiados y su dinámica clonal.

Gen/Caso	ADNc	Posición aminoácido	Tipo de mutación	Pretratamiento	Tratamiento [VAF(%)]	
LLC-1				LLC-1_pre	1ª línea IQT	
ATM	c.5644C>T	p.Arg1882*	Nonsense	46.66	LLC-1-2_tto1 nv	LLC-1-3_tto1 nv
LLC-100				LLC-100_pre	1ª línea IQT	2ª línea TD (Ibrutinib)
SF3B1	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	nv	LLC-100-2_tto1 17.87	LLC-100-3_tto2 34.82
SF3B1	c.1988C>T	p.Thr663Ile	Missense	nv	6.09	0.00
SF3B1	c.2225G>A	p.Gly742Asp	Missense	nv	1.62	0.00
LLC-11				LLC-11_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)	
SF3B1	c.2225G>A	p.Gly742Asp	Missense	49.00	LLC-11-2_tto1 48.60	
TP53	c.743G>A	p.Arg248Gln	Missense	39.58	0.00	
XPO1	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	7.06	0.00	
XPO1	c.1871A>G	p.Asp624Gly	Missense	5.41	44.00	
TP53	c.569C>T	p.Pro190Leu	Missense	2.27	0.00	
LLC-121				LLC-121_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)	
ATM	c.2735A>T	p.Gln912Leu	Missense	42.13	LLC-11-2_tto1 nv	LLC-121-3_tto1 nv
TP53	c.389T>C	p.Leu130Pro	Missense	1.10	0.00	0.00
LLC-14				LLC-14_pre	1ª línea IQT	2ª línea TD (Ibrutinib)
FBXW7	c.1514G>T	p.Arg505Leu	Missense	21.75	LLC-14-2_tto1 38.95	LLC-14-3_tto2 34.89
SF3B1	c.2110A>T	p.Ile704Phe	Missense	20.1	43.67	37.20
BIRC3	c.1658_1659insT	p.Arg555fs*12	Frameshift Indel	10.24	13.65	21.19
BIRC3	c.1639delG	p.Gln547fs*21	Frameshift Indel	10.19	11.42	7.60
BIRC3	c.1286_1287insA	p.Glu429fs*9	Frameshift Indel	1.7	2.69	0.00
LLC-15				LLC-15_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)	
EGR2	c.1066G>A	p.Glu356Lys	Missense	64.07	LLC-15-2_tto1 42.59	
TP53	c.250delG	p.Arg84fs*39	Frameshift Indel	26.53	20.88	
LLC-17				LLC-17_pre	1ª línea IQT	
EGR2	c.1066G>A	p.Glu356Lys	Missense	43.39	LLC-17-2_tto1 0.00	
LLC-18				LLC-18_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)	
SF3B1	c.1866G>C	p.Glu622Asp	Missense	1.12	LLC-18-2_tto1 2.20	
LLC-19				LLC-19_pre	1ª línea IQT	2ª línea TD (Ibrutinib)
NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	39.30	LLC-19-2_tto1 45.03	LLC-19-3_tto2 21.43
BIRC3	c.1298_1299delTT	p.Arg434fs*3	Frameshift Indel	5.89	7.41	19.30
LLC-2				LLC-2_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)	
XPO1	c.1712A>T	p.Glu571Val	Missense	15.44	LLC-2-2_tto1 8.82	LLC-2-3_tto1 17.39
NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	15.07	7.71	18.87
NFKBIE	c.758_761delCTTA	p.Tyr254fs*13	Frameshift Indel	11.46	0.00	0.00
TP53	c.659A>G	p.Tyr220Cys	Missense	7.79	1.05	1.92
LLC-24				LLC-24_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)	
MYD88	c.818T>C	p.Leu273Pro	Missense	42.61	LLC-24-2_tto1 31.01	
TP53	c.112C>T	p.Gln38*	Nonsense	42.24	32.00	
LLC-27				LLC-27_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)	
NOTCH1	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	43.54	LLC-27-2_tto1 0.00	LLC-27-3_tto1 0.00

Anexo 2: Tabla 7 (continuación) Resumen de las variantes patogénicas detectadas en los pacientes estudiados y su dinámica clonal.

Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Pretratamiento	Tratamientos [VAF(%)]		
LLC-28				LLC-28_pre	1ª línea IQT		
					LLC-28-2_tto1	LLC-28-3_tto1	
<i>FBXW7</i>	c.1315A>G	p.Thr439Ala	Missense	1.01	0.00	0.00	
<i>XPO1</i>	c.1871A>G	p.Asp624Gly	Missense	5.32	0.00	0.00	
LLC-3				LLC-3_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)		
					LLC-3-2_tto1	LLC-3-3_tto1	
<i>EGR2</i>	c.1066G>A	p.Glu356Lys	Missense	10.41	4.65	1.52	
LLC-313				LLC-313_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)		
					LLC-313-2_tto1	LLC-313-3_tto1	
<i>NOTCH1</i>	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	53.51	3.98	1.66	
LLC-33				LLC-33_pre	1ª línea IQT	2ª línea TD (Ibrutinib)	
					LLC-33-2_tto1	LLC-33-3_tto2	
<i>ATM</i>	c.7305C>A	p.Asn2435Lys	Missense	95.80	nv	nv	
<i>XPO1</i>	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	1.05	0.00	0.00	
LLC-35				LLC-35_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)		
					LLC-35-2_tto1		
<i>TP53</i>	c.417_423delCGTCCAG	p.Lys139fs*29	Frameshift Indel	16.55		0.00	
LLC-36				LLC-36_pre	1ª línea IQT		
					LLC-36-2_tto1		
<i>ATM</i>	c.4909G>T	p.Asp1637Tyr	Missense	51.89		nv	
<i>FBXW7</i>	c.1634A>G	p.Tyr545Cys	Missense	24.49		9.39	
<i>ATM</i>	c.2250+1G>T	p.?	Splice site	16.14		nv	
<i>FBXW7</i>	c.1383_1389delTTCCACT	p.Ser462fs*	Frameshift Indel	0.00		8.66	
LLC-37				LLC-37_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)		
					LLC-37-2_tto1		
<i>NOTCH1</i>	c.7246C>T	p.Gln2416*	Nonsense	44.05		45.36	
<i>SF3B1</i>	c.1996A>G	p.Lys666Glu	Missense	5.92		3.21	
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	4.95		4.95	
<i>SF3B1</i>	c.2110A>T	p.Ile704Phe	Missense	0.00		4.78	
LLC-39				LLC-39_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)		
					LLC-39-2_tto1		
<i>TP53</i>	c.450_455delCCCCCA	p.Pro150fs*	Frameshift Indel	96.71		20.61	
<i>NOTCH1</i>	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	60.99		17.88	
LLC-4				LLC-4_pre	1ª línea IQT	2ª línea TD (Ibrutinib)	
					LLC-4-2_tto1	LLC-4-3_tto2	LLC-4-4_tto2
<i>TP53</i>	c.672+1G>A	p.?	Splice site	nv	42.66	0.00	0.00
<i>TP53</i>	c.560-2A>C	p.?	Splice site	nv	15.80	2.66	0.00
<i>TP53</i>	c.358A>G	p.Lys120Glu	Missense	nv	1.73	0.00	0.00
<i>TP53</i>	c.559+1G>A	p.?	Splice site	nv	1.22	0.00	0.00
LLC-40				LLC-40_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)		
					LLC-40-2_tto1		
<i>XPO1</i>	c.1712A>T	p.Glu571Val	Missense	55.16		34.97	
<i>NOTCH1</i>	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	18.74		13.35	
<i>TP53</i>	c.845G>A	p.Arg282Gln	Missense	7.45		0.00	

Anexo 2: Tabla 7 (continuación) Resumen de las variantes patogénicas detectadas en los pacientes estudiados y su dinámica clonal.

Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Pretratamiento	Tratamientos [VAF(%)]					
LLC-42				LLC-42_pre	1ª línea IQT			2ª línea TD (Ibrutinib)		
					LLC-42-2_tto1	LLC-42-3_tto2	LLC-42-4_tto2	LLC-42-5_tto2	LLC-42-6_tto2	
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	1.03	34.84	27.73	10.00	7.75	6.53	
LLC-43				LLC-43_pre	1ª línea IQT			2ª línea TD (Ibrutinib)		
					LLC-43-2_tto1	LLC-43-3_tto2	LLC-43-4_tto2	LLC-43-5_tto2	LLC-43-6_tto2	
<i>SF3B1</i>	c.1984C>G	p.His662Asp	Missense	0.00	5.44	0.00	0.00	0.00	0.00	
LLC-46				LLC-46_pre	1ª línea IQT			2ª línea TD (Ibrutinib)		3ª línea TD (Venetoclax)
					LLC-46-2_tto1	LLC-46-3_tto2	LLC-46-4_tto2	LLC-46-5_tto2	LLC-46-6_tto3	
<i>TP53</i>	c.821T>C	p.Val274Ala	Missense	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	70.10	
<i>SF3B1</i>	c.1996A>G	p.Lys666Glu	Missense	1.01	13.64	0.00	0.00	0.00	36.40	
<i>EGR2</i>	c.1150C>A	p.His384Asn	Missense	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	35.30	
LLC-49				LLC-49_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)					
					LLC-49-2_tto1	LLC-49-3_tto1	LLC-49-4_tto1	LLC-49-5_tto1	LLC-49-6_tto1	LLC-49-7_tto1
<i>NOTCH1</i>	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	31.17	48.66	30.62	7.36	3.36	3.61	7.12
<i>TP53</i>	c.701A>G	p.Tyr234Cys	Missense	23.93	61.97	25.76	5.49	2.56	2.59	2.00
<i>TP53</i>	c.584T>C	p.Ile195Thr	Missense	6.20	8.53	5.21	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>TP53</i>	c.1024C>T	p.Arg342*	Nonsense	4.29	5.23	1.75	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>TP53</i>	c.817C>T	p.Arg273Cys	Missense	1.13	3.12	1.94	0.00	1.29	0.00	4.60
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	0.00	0.00	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00
LLC-5				LLC-5_pre	1ª línea IQT			2ª línea TD (Ibrutinib)		
					LLC-5-2_tto1		LLC-5-3_tto2		LLC-5-4_tto2	
<i>BIRC3</i>	c.1660_1671delCATGTTCTTTC	p.Glu554fs*	Frameshift Indel	51.70	68.73		53.73		26.86	
<i>XPO1</i>	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	39.81	46.60		32.43		16.54	
<i>XPO1</i>	c.1712A>T	p.Glu571Val	Missense	0.00	0.00		0.00		1.70	
LLC-50				LLC-50_pre	1ª línea IQT			2ª línea TD (Ibrutinib)		
					LLC-50-2_tto1	LLC-50-3_tto1	LLC-50-4_tto1	LLC-50-5_tto2		
<i>SF3B1</i>	c.1988C>T	p.Thr663Ile	Missense	11.35	0.00	2.49	8.91	22.96		
<i>EGR2</i>	c.1150C>A	p.His384Asn	Missense	0.00	0.00	0.00	0.00	7.04		
LLC-51				LLC-51_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)					
					LLC-51-2_tto1	LLC-51-3_tto1	LLC-51-4_tto1	LLC-51-5_tto1	LLC-51-6_tto1	LLC-51-7_tto1
<i>TP53</i>	c.476C>T	p.Ala159Val	Missense	72.53	35.28	13.14	6.21	0.00	0.00	0.00
<i>TP53</i>	c.736A>G	p.Met246Val	Missense	3.46	2.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Anexo 2: Tabla 7 (continuación) Resumen de las variantes patogénicas detectadas en los pacientes estudiados y su dinámica clonal.

Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Pretratamiento	Tratamientos [VAF(%)]								
LLC-53				LLC-53_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)								
<i>SF3B1</i>	c.1988C>T	p.Thr663Ile	Missense	45.65	LLC-53-2_tto1	LLC-53-3_tto1	LLC-53-4_tto1	LLC-53-5_tto1	LLC-53-6_tto1	LLC-53-7_tto1	LLC-53-8_tto1	LLC-53-9_tto1	LLC-53-10_tto1
					41.47	3.32	16.97	3.11	3.38				
LLC-54				LLC-54_pre	1ª línea IQT				2ª línea TD (Ibrutinib)				
<i>TP53</i>	c.763A>T	p.Ile255Phe	Missense	0.00	LLC-54-2_tto1	LLC-54-3_tto1	LLC-54-4_tto1	LLC-54-5_tto1	LLC-54-6_tto1	LLC-54-7_tto1	LLC-54-8_tto1	LLC-54-9_tto1	LLC-54-10_tto1
					1.95	2.15			0.00				
LLC-55				LLC-55_pre	2ª línea IQT			3ª línea TD (Venetoclax)					
<i>TP53</i>	c.715A>G	p.Asn239Asp	Missense	0.00	LLC-55-2_tto2	LLC-55-3_tto2	LLC-55-4_tto2	LLC-55-5_tto2	LLC-55-6_tto2	LLC-55-7_tto2	LLC-55-8_tto2	LLC-55-9_tto2	LLC-55-10_tto2
					19.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
LLC-56				LLC-56_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)								
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	12.86	LLC-56-2_tto1	LLC-56-3_tto1	LLC-56-4_tto1	LLC-56-5_tto1	LLC-56-6_tto1	LLC-56-7_tto1	LLC-56-8_tto1	LLC-56-9_tto1	LLC-56-10_tto1
<i>SF3B1</i>	c.2219G>A	p.Gly740Glu	Missense	3.81	1.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
LLC-57				LLC-57_pre	1ª línea IQT				2ª línea TD (Ibrutinib)				
<i>EGR2</i>	c.1231G>T	p.Asp411Tyr	Missense	5.97	LLC-57-2_tto1	LLC-57-3_tto1	LLC-57-4_tto1	LLC-57-5_tto1	LLC-57-6_tto1	LLC-57-7_tto1	LLC-57-8_tto1	LLC-57-9_tto1	LLC-57-10_tto1
<i>SF3B1</i>	c.1988C>T	p.Thr663Ile	Missense	0.00	26.17	7.83	1.96	1.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
LLC-58				LLC-58_pre	2ª línea IQT			5ª línea TD (Ibrutinib)			6ª línea TD (Venetoclax)		
<i>EGR2</i>	c.1231G>T	p.Asp411Tyr	Missense	98.45	LLC-58-2_tto2	LLC-58-3_tto2	LLC-58-4_tto2	LLC-58-5_tto2	LLC-58-6_tto2	LLC-58-7_tto2	LLC-58-8_tto2	LLC-58-9_tto2	LLC-58-10_tto2
<i>NOTCH1</i>	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	0.00	0.00	0.00	0.00	4.23	0.00	0.00	0.00	8.62	
<i>SF3B1</i>	c.2131G>C	p.Ala711Pro	Missense	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.99	
<i>NOTCH1</i>	c.7501C>T	p.Gln2501*	Nonsense	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.02	
<i>SF3B1</i>	c.2111T>A	p.Ile704Asn	Missense	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.51	
LLC-59				LLC-59_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)								
<i>XPO1</i>	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	39.31	LLC-59-2_tto1	LLC-59-3_tto1	LLC-59-4_tto1	LLC-59-5_tto1	LLC-59-6_tto1	LLC-59-7_tto1	LLC-59-8_tto1	LLC-59-9_tto1	LLC-59-10_tto1
<i>NFKBIE</i>	c.758_761delCTTA	p.Tyr254fs*13	Frameshift Indel	1.40	1.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>XPO1</i>	c.1655delC	p.Pro552fs*4	Frameshift Indel	1.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Anexo 2: Tabla 7 (continuación) Resumen de las variantes patogénicas detectadas en los pacientes estudiados y su dinámica clonal.

Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Pretratamiento	Tratamientos [VAF(%)]						
LLC-60				LLC-60_pre	1ª línea IQT	2ª línea IQT			3ª línea TD (Ibrutinib)		
					LLC-60-2_tto1	LLC-60-3_tto2	LLC-60-4_tto3	LLC-60-5_tto3	LLC-60-6_tto3	LLC-60-7_tto3	LLC-60-8_tto3
<i>ATM</i>	c.4490T>A	p.Leu1497Ter	Nonsense	10.00	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
<i>TP53</i>	c.641A>G	p.His214Arg	Missense	0.00	0.00	25.12	34.97	5.96	1.00	0.00	22.20
<i>TP53</i>	c.281C>G	p.Ser94*	Nonsense	0.00	0.00	22.44	0.00	4.62	0.00	0.00	16.70
LLC-61				LLC-61_pre	1ª línea IQT			2ª línea TD (Ibrutinib)			
					LLC-61-2_tto1	LLC-61-3_tto2	LLC-61-4_tto2	LLC-61-5_tto2		LLC-61-6_tto2	
<i>ATM</i>	c.2081T>C	p.Leu694Pro	Missense	13.07	nv	nv	nv	nv		nv	
<i>NOTCH1</i>	c.6214G>A	p.Gly2072Ser	Missense	12.80	20.00	7.38	0.00	0.00		0.00	
<i>NOTCH1</i>	c.6310C>T	p.Arg2104Cys	Missense	0.00	17.91	21.04	19.36	13.19		4.35	
LLC-62				LLC-62_pre	1ª línea IQT			2ª línea TD (Ibrutinib)			
					LLC-62-2_tto1	LLC-62-3_tto2	LLC-62-4_tto2	LLC-62-5_tto2	LLC-62-6_tto2	LLC-62-7_tto2	
<i>ATM</i>	c.8948C>T	p.Thr2983Ile	Missense	47.55	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
<i>XPO1</i>	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	33.50	33.50	6.38	4.93	19.04	36.36	30.30	
<i>XPO1</i>	c.1736G>T	p.Gly579Val	Missense	6.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>SF3B1</i>	c.2225G>A	p.Gly742Asp	Missense	0.00	32.59	9.25	4.83	20.70	50.67	27.90	
<i>BTK</i>	c.1442G>C	p.Cys481Ser	Missense	0.00	0.00	0.00	0.00	20.29	44.75	25.00	
<i>TP53</i>	c.452C>A	p.Pro151His	Missense	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	28.30	
LLC-63				LLC-63_pre			1ª línea IQT				
					LLC-63-2_tto1	LLC-63-3_tto1	LLC-63-4_tto1	LLC-63-5_tto1		LLC-63-6_tto1	
<i>SF3B1</i>	c.2078G>A	p.Gly693Asp	Missense	51.24	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	
LLC-64				LLC-64_pre	1ª línea IQT			2ª línea TD (Ibrutinib)			
					LLC-64-2_tto1	LLC-64-3_tto2	LLC-64-4_tto2	LLC-64-5_tto2	LLC-64-6_tto2	LLC-64-7_tto2	LLC-64-8_tto2
<i>TP53</i>	c.817C>T	p.Arg273Cys	Missense	nv	0.00	10.61	22.40	9.17	25.51	26.37	27.24
<i>TP53</i>	c.844C>T	p.Arg282Trp	Missense	nv	65.66	5.50	3.28	1.83	1.26	1.77	0.00
<i>TP53</i>	c.524G>A	p.Arg175His	Missense	nv	0.00	2.10	3.09	1.54	4.04	0.00	5.92
<i>BTK</i>	c.1442G>C	p.Cys481Ser	Missense	nv	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.37
LLC-66				LLC-66_pre			2ª línea TD (Ibrutinib)				
					LLC-66-2_tto1	LLC-66-3_tto1	LLC-66-4_tto1	LLC-66-5_tto1	LLC-66-6_tto1		
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	33.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
LLC-68				LLC-68_pre	3ª línea IQT	4ª línea IQT		5ª línea TD (Ibrutinib)			
					LLC-68-2_tto3	LLC-68-3_tto4	LLC-68-4_tto4	LLC-68-5_tto5		LLC-68-6_tto5	
<i>TP53</i>	c.830G>T	p.Cys277Phe	Missense	0.00	7.38	0.00	24.55	28.26		12.75	
<i>TP53</i>	c.135_138delGTCC	p.Ser46fs*76	Frameshift	0.00	7.00	0.00	22.12	19.01		0.00	

Anexo 2: Tabla 7 (continuación) Resumen de las variantes patológicas detectadas en los pacientes estudiados y su dinámica clonal.

Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Pretratamiento	Tratamientos [VAF(%)]										
LLC-69				LLC-69_pre	1ª línea IQT		2ª línea TD (Ibrutinib)								
<i>EGR2</i>	c.170-3A>T	p.?	Splice site	35.00	LLC-69-2_tto1	LLC-69-3_tto1	LLC-69-4_tto1	LLC-69-5_tto2							
					3.61	19.70	28.14	42.00							
LLC-70				LLC-70_pre	1ª línea IQT					LLC-70-3_tto1					
<i>SF3B1</i>	c.2219G>A	p.Gly740Glu	Missense	36.95	LLC-70-2_tto1										
					0.00										
LLC-73				LLC-73_pre	1ª línea IQT	3ª TPH	4ª línea IQT	5ª línea TD (Ibrutinib)				6ª línea TD (Venetoclax)			
<i>XPO1</i>	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	26.60	LLC-73-2_tto1	LLC-73-3_tto3	LLC-73-4_tto4	LLC-73-5_tto5	LLC-73-6_tto5	LLC-73-7_tto5	LLC-73-8_tto5	LLC-73-9_tto5	LLC-73-10_tto6	LLC-73-11_tto6	LLC-73-12_tto6
					5.95	16.38	69.84	42.64	46.07	43.37	43.31	45.10	0.00	0.00	0.00
LLC-74				LLC-74_pre	1ª línea IQT			LLC-74-4_tto1			LLC-74-5_tto1				
<i>NOTCH1</i>	c.7210C>T	p.Gln2404*	Nonsense	28.9	LLC-74-2_tto1			LLC-74-3_tto1			LLC-74-4_tto1			LLC-74-5_tto1	
					0.00			0.00			0.00			0.00	
LLC-76				LLC-76_pre	3ª línea IQT				4ª línea TD (Ibrutinib)						
<i>TP53</i>	c.79C>T	p.Pro27Ser	Missense	0.00	LLC-76-2_tto3	LLC-76-3_tto3	LLC-76-4_tto4	LLC-76-5_tto4	LLC-76-6_tto4	LLC-76-7_tto4	LLC-76-8_tto4	LLC-76-9_tto4	LLC-76-10_tto4		
					44.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
LLC-77				LLC-77_pre	1ª línea IQT	2ª línea TD (Ibrutinib)		3ª línea TD (Venetoclax)		4ª línea TPH					
<i>TP53</i>	c.763A>T	p.Ile255Phe	Missense	6.74	LLC-77-2_tto1	LLC-77-3_tto2	LLC-77-4_tto3	LLC-77-5_tto4	LLC-77-6_tto4						
					9.85	68.61	0.00	2.1						0.00	

Anexo 2: Tabla 7 (continuación) Resumen de las variantes patogénicas detectadas en los pacientes estudiados y su dinámica clonal.

Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Pretratamiento			Tratamientos [VAF(%)]			
LLC-78				LLC-78_pre	LLC-78-2_tto1	LLC-78-3_tto1	1ª línea IQT			
							LLC-78-4_tto1	LLC-78-5_tto1	LLC-78-6_tto1	
POT1	c.689C>T	p.Ala230Val	Missense	2.58	2.58	14.87	30.58	27.94	26.23	
POT1	c.273_276delGAG	p.Glu92del	Frameshift Indel	0.00	2.13	13.77	29.81	27.93	26.52	
LLC-79				LLC-79_pre	LLC-79-2_tto1	LLC-79-3_tto1	1ª línea IQT		LLC-79-5_tto1	
							LLC-79-4_tto1			
ATM	c.9119T>C	p.Ile3040Thr	Missense	32.6	nv	nv	nv	nv		
LLC-80				LLC-80_pre			1ª línea IQT			
							LLC-80-2_tto1			
ATM	c.5497-2A>C	p.?	Splice site	50.44			nv			
ATM	c.6452+1G>A	p.?	Splice site	38.48			nv			
LLC-81				LLC-81_pre	1ª línea IQT		2ª línea TD (Venetoclax)			
					LLC-81-2_tto1	LLC-81-3_tto2	LLC-81-4_tto2	LLC-81-5_tto2	LLC-81-6_tto2	
SF3B1	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	1.03	34.02	0.00	0.00	0.00	0.00	
XPO1	c.1711G>A	p.Glu571Lys	Missense	47.16	44.70	0.00	0.00	0.00	0.00	
TP53	c.517G>T	p.Val173Leu	Missense	0.00	9.97	0.00	0.00	0.00	0.00	
TP53	c.742C>T	p.Arg248Trp	Missense	0.00	3.26	0.00	0.00	0.00	0.00	

Anexo 2: Tabla 7 (continuación) Resumen de las variantes patogénicas detectadas en los pacientes estudiados y su dinámica clonal.

Gen	ADNc	Posición Aminoácido	Tipo mutación	Pretratamiento	Tratamientos [VAF(%)]			
LLC-82				LLC-82_pre	1ª línea IQT		2ª línea TD (Venetoclax)	
					LLC-82-2_tto1	LLC-82-3_tto2		
<i>SF3B1</i>	c.2111T>G	p.Ile704Ser	Missense	0.00	10.74	0.00		
<i>BIRC3</i>	c.1283_1284delCC	p.Glu429fs*8	Frameshift Indel	0.00	10.12	0.00		
<i>XPO1</i>	c.1712A>T	p.Glu571Val	Missense	0.00	1.83	0.00		
LLC-84				LLC-84_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)			
					LLC-84-2_tto1	LLC-84-3_tto1	LLC-84-4_tto1	LLC-84-5_tto1
<i>NOTCH1</i>	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	31.17	0.00	0.00	0.00	0.00
LLC-85				LLC-85_pre	1ª línea IQT		2ª línea TD (Ibrutinib)	
					LLC-85-2_tto1	LLC-85-3_tto2		
<i>TP53</i>	c.325T>G	p.Phe109Val	Missense	0.00	26.08	12.20		
<i>TP53</i>	c.733G>A	p.Gly245Ser	Missense	0.00	7.18	2.10		
<i>TP53</i>	c.738G>T	p.Met246Ile	Missense	0.00	6.59	9.72		
LLC-86				LLC-86_pre	1ª línea IQT		2ª línea TD (Ibrutinib)	
					LLC-86-2_tto1	LLC-86-3_tto2		
<i>SF3B1</i>	c.1876A>T	p.Asn626Tyr	Missense	45.09	4.16	28.00		
<i>TP53</i>	c.743G>A	p.Arg248Gln	Missense	29.12	4.78	27.26		
<i>TP53</i>	c.722C>A	p.Ser241Tyr	Missense	0.00	0.00	7.18		
LLC-89				LLC-89_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)			
					LLC-89-2_tto1	LLC-89-3_tto1	LLC-89-4_tto1	
<i>NOTCH1</i>	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	13.06	2.83	0.00	0.00	
LLC-91				LLC-91_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)			
					LLC-91-2_tto1	LLC-91-3_tto1		
<i>TP53</i>	c.637C>T	p.Arg213*	Nonsense	80.58	2.38	67.79		
<i>POT1</i>	c.34_35insTA	p.Thr12fs*4	Frameshift Indel	34.16	0.00	0.00		
<i>BTK</i>	c.1442G>C	p.Cys481Ser	Missense	0.00	0.00	25.90		
<i>FBXW7</i>	c.*27T>A	p.?	3pUTR	0.00	0.00	5.87		
<i>FBXW7</i>	c.1334T>C	p.Val445Ala	Missense	0.00	0.00	4.40		
LLC-92				LLC-92_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)			
					LLC-92-2_tto1			
<i>ATM</i>	c.8560C>T	p.Arg2854Cys	Missense	40.89	nv			
<i>ATM</i>	c.6452+1G>A	p.?	Splice site	23.30	nv			
<i>TP53</i>	c.527G>C	p.Cys176Ser	Missense	18.18	2.43			
LLC-93				LLC-93_pre	1ª línea IQT	2ª línea IQT	3ª línea TD (Ibrutinib)	
					LLC-93-2_tto1	LLC-93-3_tto2	LLC-93-4_tto3	LLC-93-5_tto3
<i>FBXW7</i>	c.1319A>T	p.Asp440Val	Missense	13.55	34.10	35.63	4.95	1.19
LLC-97				LLC-97_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)			
					LLC-97-2_tto1	LLC-97-3_tto1	LLC-97-4_tto1	
<i>FBXW7</i>	c.1514G>T	p.Arg505Leu	Missense	1.93	0.00	0.00	0.00	
<i>NOTCH1</i>	c.7541_7542delCT	p.Pro2514fs*4	Frameshift Indel	17.06	33.45	28.76	11.74	
<i>SF3B1</i>	c.2225G>A	p.Gly742Asp	Missense	8.24	5.58	3.56	2.79	
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	p.Lys700Glu	Missense	3.13	0.00	0.00	0.00	
LLC-99				LLC-99_pre	1ª línea TD (Ibrutinib)			
					LLC-99-2_tto1	LLC-99-3_tto1		
<i>MYD88</i>	c.818T>C	p.Leu273Pro	Missense	47.15	10.92	2.68		

Anexo 2: Tabla 8 Principales características clínicas y biológicas de la serie a estudio según la primera línea de tratamiento recibida. (RIQ: rango intercuartil; ND: no determinado).

Parámetros clínicos	Categoría	Inmunoquimioterapia (n=57)	Ibrutinib (n=39)
Sexo (masculino), n (%)		34 (60%)	
Edad (años), Media (RIQ)		67 (55-73)	65 (61-71)
ECOG performance status, n (%)	0	51 (89)	28 (72)
	1	1 (2)	11 (28)
	2	2 (4)	0 (0)
Síntomas B, n (%)		6 (10)	3 (8)
Linfoadenopatías, n (%)		43 (75)	32 (82)
Esplenomegalia, n (%)		19 (33)	10 (26)
Hepatomegalia, n (%)		6 (10)	3 (8)
Cifras hematológicas			
Hemoglobina, Mediana (RIQ), g/dL		12.30 (10.7-13.70)	12.3 (11.5-13.8)
Leucocitos totales, Mediana (RIQ), $\times 10^9/L$		50.99 (33.90 - 104.54)	82.7 (22.52-135.69)
Neutrófilos absolutos, Mediana (RIQ), $\times 10^9/L$		4.29 (2.63-5.75)	4.2 (3.02-5.68)
Linfocitos absolutos, Mediana (RIQ), $\times 10^9/L$		40.09 (25.00-97.55)	72.60 (18.20-140.41)
Plaquetas, Mediana (RIQ), $\times 10^9/L$		162.0 (99.00-221.00)	179.00 (138.00-208.00)
Parámetros bioquímicos			
Lactato deshidrogenasa (LDH), Mediana (RIQ), U/L		383.00 (309.00-482.00)	367.0 (288.25-493.75)
LDH elevado (>1xsuperior al límite normal), n (%)		13 (23)	11 (28)
$\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2$), Mediana (RIQ), mg/dL		2.90 (2.40-4.60)	3.0 (2.6-4.0)
$\beta 2$ elevado (>1xsuperior al límite normal), n (%)		28 (49)	17 (44)
Estadificación			
Estadío Rai, n (%)	0	2 (3)	5 (12)
	I-II	33 (58)	19 (49)
	III-IV	22 (39)	15 (39)
Estadío Binet, n (%)	A	15 (26)	16 (41)
	B	26 (46)	13 (33)
	C	16 (28)	10 (26)
Estudio citogenético			
Alteración en el número de copias (FISH), n (%)		33 (58)	32 (82)
	del(13q14)	16 (28)	23 (59)
	trisomía 12	13 (23)	6 (15)
	del(11q22)	9 (16)	5 (13)
	del(17p13)	2 (3)	8 (20)
Cartiotipo normal, n (%)		13/25	12/24
	1-2 lesiones	11 (19)	10 (26)
	Complejidad baja 3	1 (2)	0 (0)
	Complejidad intermedia 4	1 (2)	1 (3)
	Complejidad alta 5	0 (0)	1 (3)
Nº de tratamientos, Mediana (RIQ)		2 (1-2)	1 (1)
Nº de tratamientos LLC	1	24 (42)	53 (100)
	2	23 (40)	0 (0)
	3	3 (5)	0 (0)
	4	3 (5)	0 (0)
	5	0 (0)	0 (0)
	6	2 (3)	0 (0)
	7	1 (2)	0 (0)
	8	1 (2)	0 (0)
Recaída, n (%)		37 (65)	3 (8)
Exitus		11 (19)	1 (3)

Anexo 2: Tabla 9 Posición genómica de los amplicones incluidos en el panel IBR-R.

Panel_IBR-R							
Cromosoma	Amplicon_inicio	Amplicon_fin	Amplicon_ID	Cromosoma	Amplicon_inicio	Amplicon_fin	Amplicon_ID
chr16	81891453	81891531	PLCF2_e10a1	chrX	100614260	100614358	BTK_e10a1
chr16	81891520	81891596	PLCF2_e10b1	chrX	100613600	100613711	BTK_e11a1
chr16	81893693	81893800	PLCF2_e11b1	chrX	100613356	100613446	BTK_e12a1
chr16	81895738	81895831	PLCF2_e12a1	chrX	100613284	100613363	BTK_e12b1
chr16	81895816	81895939	PLCF2_e12b1	chrX	100612488	100612582	BTK_e13a1
chr16	81900604	81900697	PLCF2_e13a1	chrX	100611833	100611952	BTK_e14a1
chr16	81900669	81900797	PLCF2_e13b1	chrX	100611725	100611840	BTK_e14b1
chr16	81905386	81905457	PLCF2_e14a1	chrX	100611200	100611260	BTK_e15a1
chr16	81905453	81905580	PLCF2_e14b1	chrX	100610993	100611097	BTK_e15a2
chr16	81907675	81907789	PLCF2_e15a1	chrX	100611091	100611209	BTK_e15b1
chr16	81908494	81908611	PLCF2_e16a1	chrX	100609612	100609688	BTK_e16a1
chr16	81908389	81908501	PLCF2_e16b1	chrX	100608843	100608947	BTK_e17a1
chr16	81910512	81910626	PLCF2_e17a1	chrX	100608938	100609001	BTK_e17b1
chr16	81910619	81910727	PLCF2_e17b1	chrX	100608242	100608362	BTK_e18a1
chr16	81912619	81912738	PLCF2_e18a1	chrX	100608128	100608247	BTK_e18b1
chr16	81912559	81912631	PLCF2_e18b1	chrX	100604854	100604956	BTK_e19b1
chr16	81919550	81919675	PLCF2_e19a1	chrX	100632913	100633028	BTK_e1a1
chr16	81919473	81919562	PLCF2_e19b1	chrX	100632805	100632953	BTK_e1b1
chr16	81786127	81786238	PLCF2_e1a2	chrX	100630195	100630307	BTK_e2a1
chr16	81786059	81786177	PLCF2_e1b1	chrX	100630102	100630202	BTK_e2b1
chr16	81921170	81921292	PLCF2_e20b1	chrX	100629513	100629629	BTK_e3a1
chr16	81923472	81923563	PLCF2_e21a1	chrX	100626610	100626708	BTK_e4a1
chr16	81923532	81923632	PLCF2_e21b1	chrX	100624964	100625075	BTK_e5a1
chr16	81927028	81927147	PLCF2_e22a1	chrX	100617704	100617817	BTK_e6a1
chr16	81927137	81927223	PLCF2_e22b1	chrX	100617527	100617606	BTK_e6a2
chr16	81928552	81928639	PLCF2_e23a1	chrX	100617601	100617710	BTK_e6b1
chr16	81931581	81931690	PLCF2_e24a1	chrX	100617143	100617258	BTK_e7a1
chr16	81931480	81931592	PLCF2_e24b1	chrX	100615662	100615752	BTK_e8a1
chr16	81934419	81934544	PLCF2_e25b1	chrX	100615547	100615671	BTK_e8b1
chr16	81936164	81936285	PLCF2_e26a1	chrX	100615062	100615143	BTK_e9a1
chr16	81936275	81936388	PLCF2_e26b1				
chr16	81937754	81937870	PLCF2_e27a1				
chr16	81937860	81937982	PLCF2_e27b1				
chr16	81938797	81938923	PLCF2_e28b1				
chr16	81939836	81939967	PLCF2_e29a1				
chr16	81939962	81940075	PLCF2_e29b1				
chr16	81854428	81854521	PLCF2_e2a1				
chr16	81854516	81854597	PLCF2_e2b1				
chr16	81946157	81946275	PLCF2_e30a1				
chr16	81956681	81956808	PLCF2_e31-32a1				
chr16	81956795	81956918	PLCF2_e31-32b1				
chr16	81957943	81958043	PLCF2_e33-a1				
chr16	81858253	81858364	PLCF2_e3b1				
chr16	81859103	81859217	PLCF2_e4b1				
chr16	81869189	81869313	PLCF2_e5a1				
chr16	81870831	81870955	PLCF2_e6b1				
chr16	81880862	81880941	PLCF2_e7a1				
chr16	81880936	81881032	PLCF2_e7b1				
chr16	81883259	81883384	PLCF2_e8b1				
chr16	81889156	81889214	PLCF2_e9a1				
chr16	81889207	81889298	PLCF2_e9b1				

Anexo 2: Tabla 10 Multiplex A y B con los cebadores correspondientes del panel IBR-R.

Pool Multiplex A	Pool Multiplex B
Cebadores gen <i>BTK</i>	Cebadores gen <i>BTK</i>
>e1a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCACAGAAAGCTTTACCTCTAA	>e1b1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATGGATCCCTTTCTTTTCAC
>e1a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACAGCCTGAAAATGTGGT	>e1b1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGCCTCCACCTCTAGATCAT
>e2b1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAAAAGAAAACATCACCTCTAAA	>e2a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCTCAGGAACCTTCATTATCA
>e2b1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCAAGTCTTGATATCTTGA	>e2a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAAGAGAAAACAGGGCCTTC
>e3a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTctccattttctctcattctact	>e4a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGCATCAACCAATAACCATTT
>e3a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTccccatctcagacattggt	>e4a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTTTCGAGATTTGGTGAGAGAA
>e5a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGTGAAGTCTGTGTTTTTCATC	>e6b1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGGCTTCTCCTCCATGTC
>e5a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCTCTTTCTTTGGAAACATT	>e6b1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTAGCATTTTTGGCTGTCTGA
>e6a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATCATGTGAGCCAAGTGGT	>e8a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTCCTACCTTTTCTCTAA
>e6a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCAGAAAGAAGAGAGATCA	>e10a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCATTTCATTGGCATGTAATC
>e6a2_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGATGGCAGTATCTCTGCT	>e10a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTATGACCAGGAGCCACTC
>e6a2_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAACAGTCAAAGGAGAAAGAAAT	>e10a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATGCAAGGAGAATGCTGTGT
>e7a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTTTCTAAAGTGCATT	>e11a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGAACCACTTCTCTCTAC
>e7a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCATTAAAGCAGTGGCAGCAC	>e11a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGCCTTGGAAATAGTACAC
>e9a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACTGCCACATTGTTTCCTTC	>e12a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTTTGTGCCAAAGTTACTGA
>e9a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGAAGATTGTTGGACTGACA	>e12a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGTCTGAAAAGGTGCTTC
>e12b1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCACCTCAGAGCCAGTATTACCT	>e13a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCAACAGCATGACCTCTCTC
>e12b1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGAACCTCTCTCAGTTGC	>e13a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCACCTACCCAGAGAAATAA
>e14b1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGGCCAGTACGACGTG	>e14a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAAGAAATCACCAAGACTTT
>e14b1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGGTTGTTGTGAATTCCT	>e14a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGAGCCTTTCTTGATCATCTT
>e15b1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTATGGCTCTGCACCAA	>e15a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTAGTTCCTTGCCCTTCTCTG
>e15b1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGTATTCCATGGCTTCACAG	>e15a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTACTCAGTGATGATGAAGATGG
>e17a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGATGATGAATACACAAGCTC	>e15a2_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGCTGCTAGAGATGTGCAAG
>e17a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCTTTGAGCTGTATAATCTGTGTA	>e15a2_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTATGATATATCTCCACTGCTACTTC
>e18a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAAAAAGACTGCAACCAATTT	>e16a1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCACTGGTCTCTGTTTGCAC
>e18a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCAGATGAGGCTGTAG	>e16a1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAAAGATGAAAAGCCACA
>e19b1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTAGCCACTTAACACTTTACTTTTTC	>e17b1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAAGCCTCAAAATCTAATG
>e19b1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGGAGAAGAGAAGTAGAACCA	>e17b1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCGACTGGAAATTTGG
>e8b1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGAAGCTGAAAAGTTGTGG	>e18b1_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACTTGCCCAAGGCCTAC
>e8b1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCAGGAAGGGCTGGTGT	>e18b1_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGCTGAATGGCCAGCTAA

Anexo 2: Tabla 10 (continuación) Multiplex A y B con los cebadores correspondientes del panel IBR-R.

Cebadores gen <i>PLCy2</i>	Cebadores gen <i>PLCy2</i>
>e1a1_F	>e1b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTTCTGATTCTCCCGATT	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGATCAAGAGAGCCCTGGAG
>e1a1_R	>e1b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGAAAGCTGAACACAGTCA	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAGCGAGTACTCACAGAAGC
>e1a2_F	>e2b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGAAACCTCCAGGTGAT	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGCAGCAAAGCAGTTC
>e1a2_R	>e2b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACAGGAAGGTGGACAGGTG	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGGAGAAAGGCACAGAAACA
>e2a1_F	>e7b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCAGCTTCTAATTGGCTCAT	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCGATGAATTCAAAAGGATTTC
>e2a1_R	>e7b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGTGAAGCAGCAGTCTTCTTT	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCTGCACACACAGGCATC
>e5a1_F	>e8b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTGAAAACCTCAAGGTGAC	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTAACTGCACCCCTTTCC
>e5a1_R	>e8b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCAAAAATCCAGGCTGA	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGACTGCCCCAGCAGCAT
>e7a1_F	>e9b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAATCTTTCCGTTTTGCATT	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGATCTGAACAAAGTCCGTGA
>e7a1_R	>e9b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCACCCAGGATGAACA	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATCAAAAAGTCAACCCCAAG
>e9a1_F	>e10b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCACTTTGCTGATCTCGTTC	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGCATCTGGGATGAGAAG
>e9a1_R	>e10b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGTGTCATCAATGAACCTTGT	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCATCACAGGCTCATCTGAAA
>e10a1_F	>e12b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCAACGTGATGATCGGTCT	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCTCCTGTAGTGGACTGCT
>e10a1_R	>e12b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTTCATGTCCTGCATGTCC	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGTCACACCACCCAGAAATC
>e12a1_F	>e13b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTAACTGAACTGGTGTGTGG	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGGCAACAGCGTCACAT
>e12a1_R	>e13b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGTAGATGACCGGCTTCC	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTGGACGCCAACAGCAG
>e13a1_F	>e14b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGTCCACCCCTCTTCT	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGATGTCAACATGGAGGACAA
>e13a1_R	>e14b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCTTCTGCAACAGCAGGT	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACAGCGTATTCTCAGAGC
>e14a1_F	>e17b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCCATGGAGACAGCCTATGT	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTCACCTTCAGCAGCATCTA
>e14a1_R	>e17b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCTGTGCTGTGTTGCTC	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCTGTCCACCTCAGAC
>e17a1_F	>e18b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCACTGATGGCTCCTCT	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCACTGACAGCCTGGAGA
>e17a1_R	>e18b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCGCGGTAGTCTGGGAT	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATCCTCATCAGCATGTCTCTC
>e18a1_F	>e19b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGTACTATGACAGCCTGAGC	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCATGTCAACCTGTGTTCT
>e18a1_R	>e19b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTCTGTAGAGCATGT	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACGAGCTCCACCAGACTC
>e19a1_F	>e20b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTTGTGTGGGGACCTC	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCCAGGAGCATGGATTATT
>e19a1_R	>e20b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCACCATAACAAGGGAGTC	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGTACTCCAAAATCATGTG
>e21a1_F	>e21b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTGACCTTTCTCTTCTG	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACAAGCCAAGCGAAG
>e21a1_R	>e21b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCTTGGAGACATTGGGAT	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAAGAAGGGACAAAGTCAAGC
>e22a1_F	>e22b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGTGCAGATGAGCAGTAGT	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACTCCCATCCAACACTGCTC
>e22a1_R	>e22b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCCTCGAAGTCTGCAGTTG	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCCTGAAAACCTGGACCT
>e23a1_F	>e24b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTAACGTGAGTTATGTTCTTCT	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGGCTGATTGGACATTTCT
>e23a1_R	>e24b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGGAAATCCAGGCTAAGATG	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCACTCAAAGAGCTCCTCCAC
>e24a1_F	>e26b1_F

Anexo 2: Tabla 10 (continuación) Multiplex A y B con los cebadores correspondientes del panel IBR-R.

Cebadores gen <i>PLCy2</i>	Cebadores gen <i>PLCy2</i>
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATCCTCCGGTGGAGTTTG	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTACAATCAAAGGGCCCTGAC
>e24a1_R	>e26b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCAAAGCCCTCAGAATGC	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACGGGACTACCTTCAGTC
>e26a1_F	>e27b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACTGATGACCTTTTCTCTGTG	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGAAATATGACCCGATGC
>e26a1_R	>e27b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCAACTCTTGTCCCTTTGG	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCCCTAGACATGGGTTC
>e27a1_F	>e28b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGCGTTCACTTCTCTTC	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAATGCTTCCCTTGGTGC
>e27a1_R	>e28b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTATCAGGATCTTCTCTGG	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGGGGCCAAGGTGACT
>e29a1_F	>e29b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAAGGATGCGGAGATTGTC	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATTGAAATTTATGACCCAAA
>e29a1_R	>e29b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCCAAAGCGCAGAAATG	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCCAAATCGAACATCTTAAT
>e30a1_F	>e31_32b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTACTGCTTTGCATTTTC	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTACACACACCAGAACTTGC
>e30a1_R	>e31_32b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGGAACCTTAACTGGTGT	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATCATCACCGTGCCTAGAGA
>e31_32a1_F	>e3b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACCACATGGTTGTCTCTCC	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGATTCTTGTCTCCCTTC
>e31_32a1_R	>e3b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCTTTAACCGGGCATCC	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAATCAACAGGCAAAAGC
>e33_a1_F	>e4b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCACTGCTGATGGTAAATC	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCTTCTCTCTTTTGTCTCA
>e33_a1_R	>e4b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTTCTCTACATGCAAAACA	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTTGAAGGTTTAAAGA
>e25b1_F	>e6b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGGCACTAAAGACAGTGAA	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGACATCAAAAATCATGTGG
>e25b1_R	>e6b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAGTTATAGGGCATGTTCTGG	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAACAGAAACATCACTTGATCACT
>e16b1_F	>e11b1_F
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTTTGGTCAAGGCTTCA	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACTCTCACAGGCCACCT
>e16b1_R	>e11b1_R
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCCATGCAGTATTCT	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCCACCAAGAAGGAGCTA
	>e16a1_F
	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGGACGAGTGCCGAGAAG
	>e16a1_R
	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGAGAAGAAGGTAGGCGTTC
	>e15a1_F
	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGGGCACTAATACCAAGTTT
	>e15a1_R
	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTCCTCCCTATGTGGCTA

Anexo 2: Tabla 11 Cálculo de la DS y CV para la variante BTK:c.1442A>C y PLCG2:c.1990C>T al 10, 5, 2 y 1% de cada una de ellas y a 1000, 750, 500, 250 y 100 lecturas por amplicón. No se detectó ninguna variante en la muestra WT.

VAF (%) esperado	BTK:c.1442A>C					PLCG2:c.1990C>T				
	Cobertura	VAF (%) observado	Promedio	SD	CV (%)	Cobertura	VAF (%) observado	Promedio	SD	CV (%)
10%	1000	9.89				1000	10.23			
	1000	10.03	10.02	0.13	1.25	1000	10.11	10.13	0.10	0.95
	1000	10.14				1000	10.04			
	500	9.99				500	10.09			
	500	9.81	10.06	0.30	2.95	500	10.73	10.22	0.45	4.45
	500	10.39				500	9.85			
	250	11.11				250	10.25			
	250	9.87	10.54	0.63	5.93	250	11.39	10.45	0.86	8.21
	250	10.63				250	9.71			
5%	100	11.89				100	12.16			
	100	10.09	10.55	1.18	11.14	100	11.07	11.03	1.15	10.43
	100	9.68				100	9.86			
	1000	5.83				1000	4.93			
	1000	5.17	5.54	0.34	6.07	1000	5.26	5.07	0.17	3.40
	1000	5.61				1000	5.01			
	500	5.89				500	5.03			
	500	4.84	5.28	0.55	10.33	500	5.79	5.23	0.50	9.47
	500	5.11				500	4.86			
2%	250	6.39				250	5.22			
	250	5.68	5.64	0.77	13.67	250	6.09	5.38	0.65	11.99
	250	4.85				250	4.83			
	100	7.14				100	7.81			
	100	5.28	5.67	1.32	23.26	100	5.59	6.68	1.11	16.64
	100	4.59				100	6.63			
	1000	2.38				1000	1.94			
	1000	1.95	2.18	0.22	9.93	1000	2.23	2.07	0.15	7.06
	1000	2.21				1000	2.05			
1%	500	2.46				500	2.09			
	500	1.82	2.12	0.32	15.13	500	1.81	2.15	0.38	17.6
	500	2.09				500	2.56			
	250	2.59				250	2.72			
	250	1.61	2.02	0.51	25.33	250	3.09	2.55	0.65	25.43
	250	1.85				250	1.83			
	100	3.34				100	1.61			
	100	2.18	2.34	0.93	40.01	100	3.15	2.46	0.78	31.8
	100	1.49				100	2.63			
1%	1000	1.23				1000	0.91			
	1000	1.41	1.24	0.17	13.75	1000	1.29	1.07	0.2	18.22
	1000	1.07				1000	1.02			
	500	1.49				500	1.09			
	500	1.72	1.40	0.38	27.12	500	1.47	1.17	0.27	22.59
	500	0.98				500	0.96			
	250	0.89				250	1.53			
	250	1.19	1.32	0.51	38.78	250	1.91	1.47	0.47	32.17
	250	1.89				250	0.97			
1%	100	2.17				100	1.51			
	100	1.06	1.37	0.70	51.38	100	2.14	1.5	0.65	43.00
	100	0.87				100	0.85			

Anexo 2: Tabla 12 Cobertura mínima y media alcanzada en las muestras de seguimiento por región a estudio.

Gen	Exón	Número amplicones	Cobertura mínima	Cobertura media	Gen	Exón	Número amplicones	Cobertura mínima	Cobertura media	Gen	Exón	Número amplicones	Cobertura mínima	Cobertura media
TP53	1	1	8.229,50	9.109,25	PLCG2	1	2	14.976,00	15.011,75	BTK	1	2	42.251,00	58.163,50
	2	1	6.975,00	8.761,00		2	2	14.367,00	14.498,00		2	2	20.917,50	20.941,00
	3	1	4.783,00	5.271,50		3	1	2.544,00	2.544,75		3	1	1.462,50	1.712,00
	4	4	33.826,50	37.342,50		4	1	317,50	317,50		4	1	2.465,00	3.832,00
	5	2	12.890,00	17.837,50		5	1	7.357,00	7.382,00		5	1	183,00	216,00
	6	2	6.692,50	6.701,25		6	1	17,00	7.321,00		6	3	39.679,00	40.754,50
	7	2	15.211,50	17.066,00		7	2	10.103,50	10.107,50		7	1	12.849,00	14.567,50
	8	2	13.657,50	13.751,00		8	1	55.980,50	60.082,50		8	2	43.084,50	26.597,50
	9	1	10.364,00	11.372,00		9	2	67.116,00	67.642,25		9	1	7.805,00	7.707,50
	10	2	18.474,50	19.327,00		10	2	13.573,00	13.817,25		10	1	25.706,50	22.605,50
	11	1	2.249,50	2.789,00		11	1	5.767,50	5.792,00		11	1	8.830,00	10.501,00
BIRC3	6	3	39.784,50	49.647,25	12	2	18.277,50	18.295,00	12	2	43.253,50	48.505,50		
	7	3	22.830,50	35.145,50	13	2	3.626,50	3.632,25	13	1	20.640,50	28.502,00		
	8	1	15.780,50	15.965,25	14	2	2.650,00	2.653,00	14	2	30.642,00	31.263,50		
	9	2	15.113,50	22.906,25	15	1	193,00	193,25	15	3	68.176,00	75.784,00		
NOTCH1	34	15	31.618,50	46.863,00	16	2	18.302,50	18.316,25	16	1	28.453,50	36.475,50		
MYD88	5	2	22.617,00	22.817,75	17	2	9.678,50	9.687,00	17	2	58.061,50	37.514,50		
SF3B1	14	3	28.605,00	33.070,75	18	2	26.459,00	26.491,75	18	2	13.009,50	12.228,00		
	15	2	12.280,50	15.991,25	19	2	48.040,00	48.084,00	19	1	3.149,50	2.848,50		
	16	2	5.843,50	9.116,50	20	1	35.089,00	35.138,25						
NFKBIE	1	8	26.415,00	30.324,53	21	2	19.266,50	19.271,25						
XPO1	14	1	26.648,00	26.827,50	22	2	18.630,00	18.963,75						
	15	2	52.383,00	52.752,50	23	1	2.230,00	2.230,50						
	16	2	66.940,00	66.960,00	24	2	1.319,00	1.349,00						
EGR2	1	1	157,00	420,50	25	1	8.649,00	8.651,50						
	2	13	131.897,00	133.455,50	26	2	6.012,50	6.020,75						
FBXW7	8	2	57.761,00	57.849,00	27	2	17.195,00	17.201,50						
	9	2	34.039,00	35.046,50	28	1	49.952,50	49.981,25						
	10	3	79.642,00	80.000,50	29	2	13.255,00	17.007,50						
	11	2	63.042,00	63.064,50	30	1	4.281,00	4.283,00						
	12	3	28.775,00	35.673,00	31-32	2	21.160,00	21.196,75						
PO1	6	2	47.475,00	47.489,50	33	1	537,00	21.196,75						
	7	2	20.538,00	21.726,50										
	8	4	110.068,00	110.116,50										
	9	2	61.461,00	61.567,50										

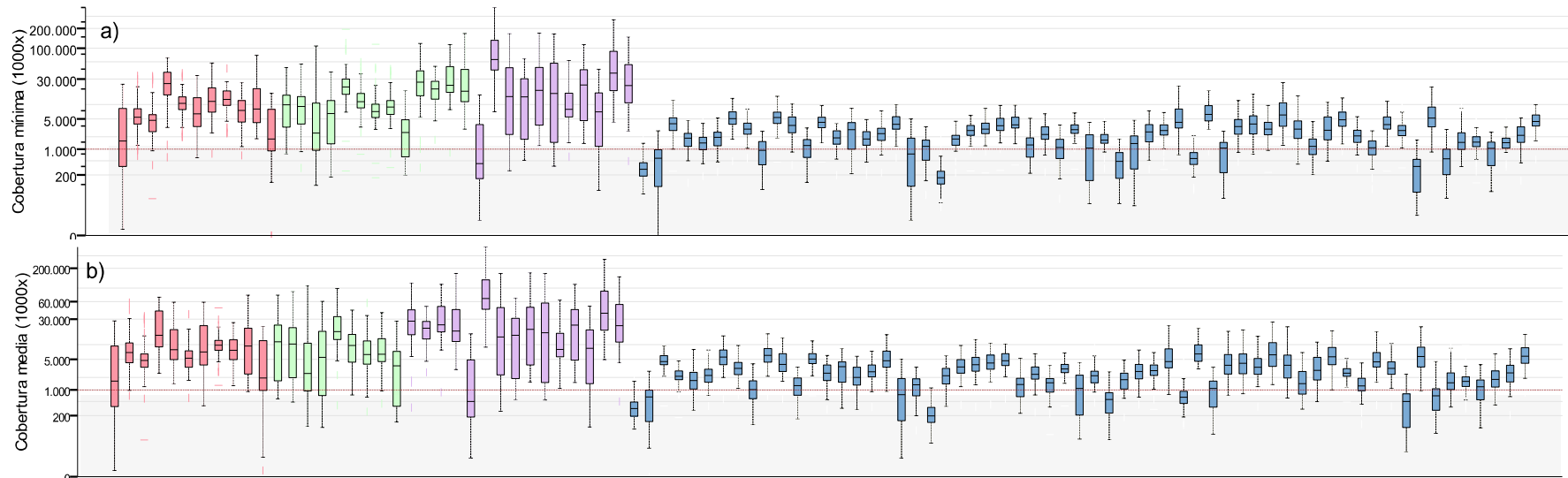
Anexo 2: Tabla 13 Características basales de los pacientes incluidos en los distintos grupos, según la cinética linfocitaria durante el tratamiento con Ibrutinib. Sexo: hombres (%). U-LLC: estado mutacional IGVH no mutado. Pre-RLA: recuento linfocitario absoluto en la muestra inicial previa al tratamiento. RLA: recuento linfocitario absoluto (Todos los valores están expresados en porcentaje, a excepción edad y pre-RLA).

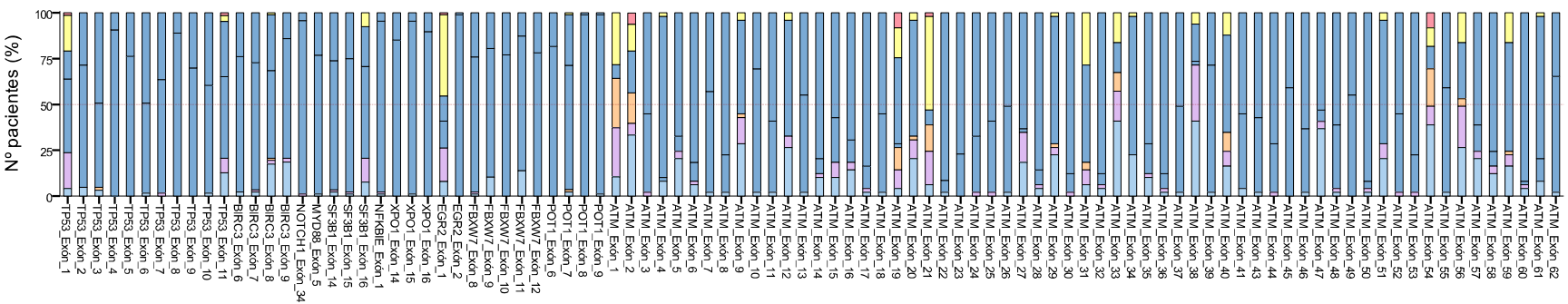
	Casos (n)	Edad (años, mediana)	Sexo	LLC-IPi (alto, muy alto)	U-LLC	del(17p13)/TP53 _{mut}	Linfoadenopatías	Pre-RLA (mediana, x10 ⁹ /L)	Variación RLA
Grupo 1	11	63	36	36	36	36	64	22,3	(+) 94,91
Grupo 2	15	64	61	73	73	53	27	180,15	(-) 92,86
Grupo 3	8	65	75	25	50	0	50	83,95	(-) 19,17

10 Anexo: figuras.

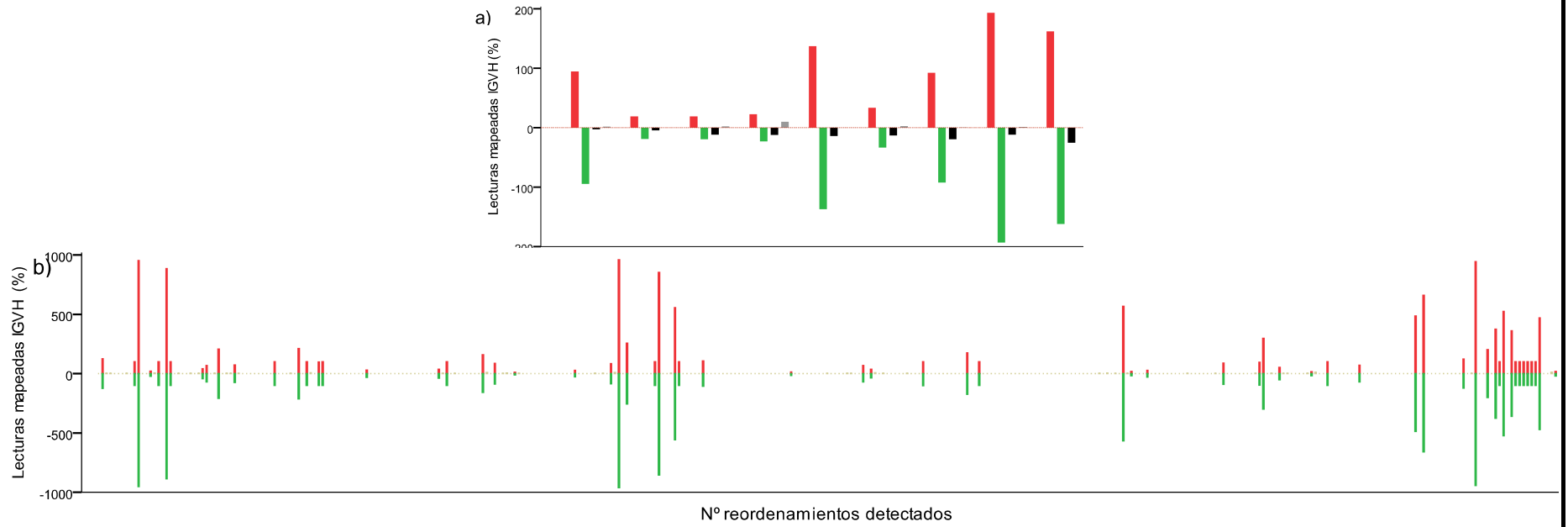
10.1 Anexo 1: Resultados

Anexo 1: Figuras 1 Ilustración de la distribución de la cobertura obtenida a lo largo de todas las regiones a estudio en la muestra pretratamiento. a) Diagrama de cajas con la distribución de la cobertura mínima de cada caso pretratamiento, para cada región target. b) Distribución de la cobertura media obtenida para cada muestra pretratamiento para cada región particular. c) Diagrama de barras que muestra el total de casos con un >85% de cada región a estudio cubierta por una cobertura >1000x (azul), >500x (lila), >250x (naranja), >100x (amarillo), >25x (rojo claro), <25x (rojo oscuro). (Estos cut-off han sido extraídos del estudio publicado por Spencer et al. 2014; límite de 1000 lecturas marcado con línea discontinua roja).

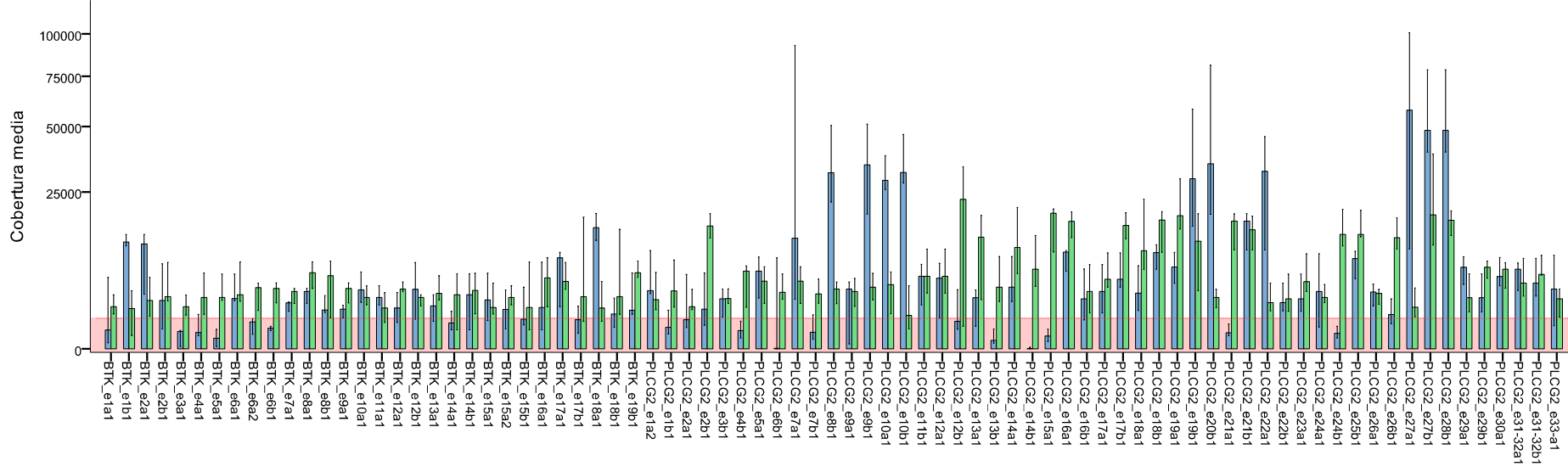




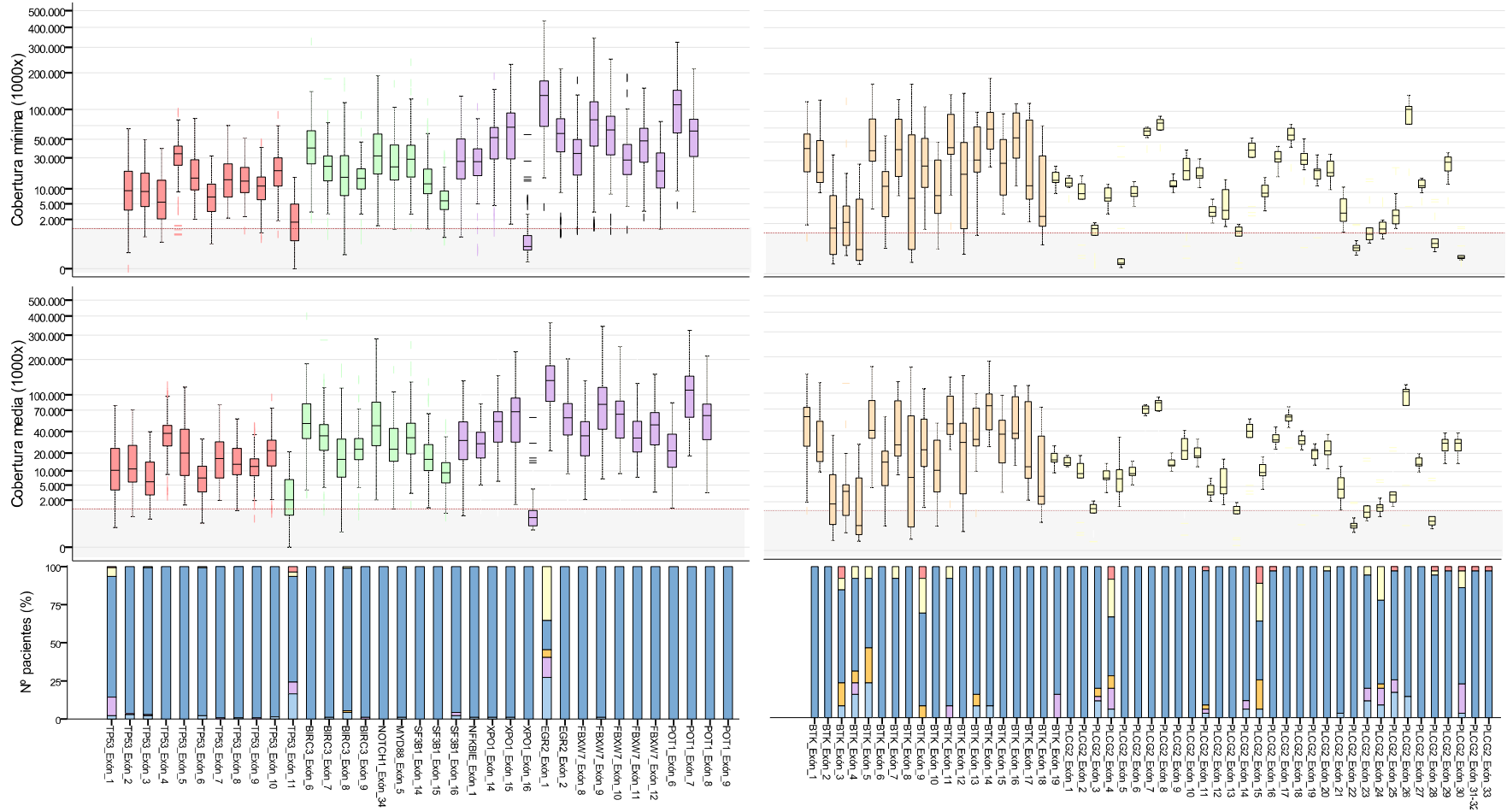
Anexo 1: Figuras 2 *Porcentaje clonal de los diferentes reordenamientos IGVH detectados por NGS.* Diagrama de barras, en el que los valores positivos del eje Y, representan el porcentaje clonal de los diferentes reordenamientos de IGVH detectados, mientras que los valores negativos muestran las proporciones del % entre los clones consecutivos de una muestra. El reordenamiento mayoritario coloreado en rojo, reordenamientos subclonales en gris; el valor máximo de ratio entre clones en verde, y el resto de proporciones clonales en negro. a) 9 muestras con doble reordenamiento; b) 63 muestras ejemplo de la cohorte total, con un solo clon predominante.



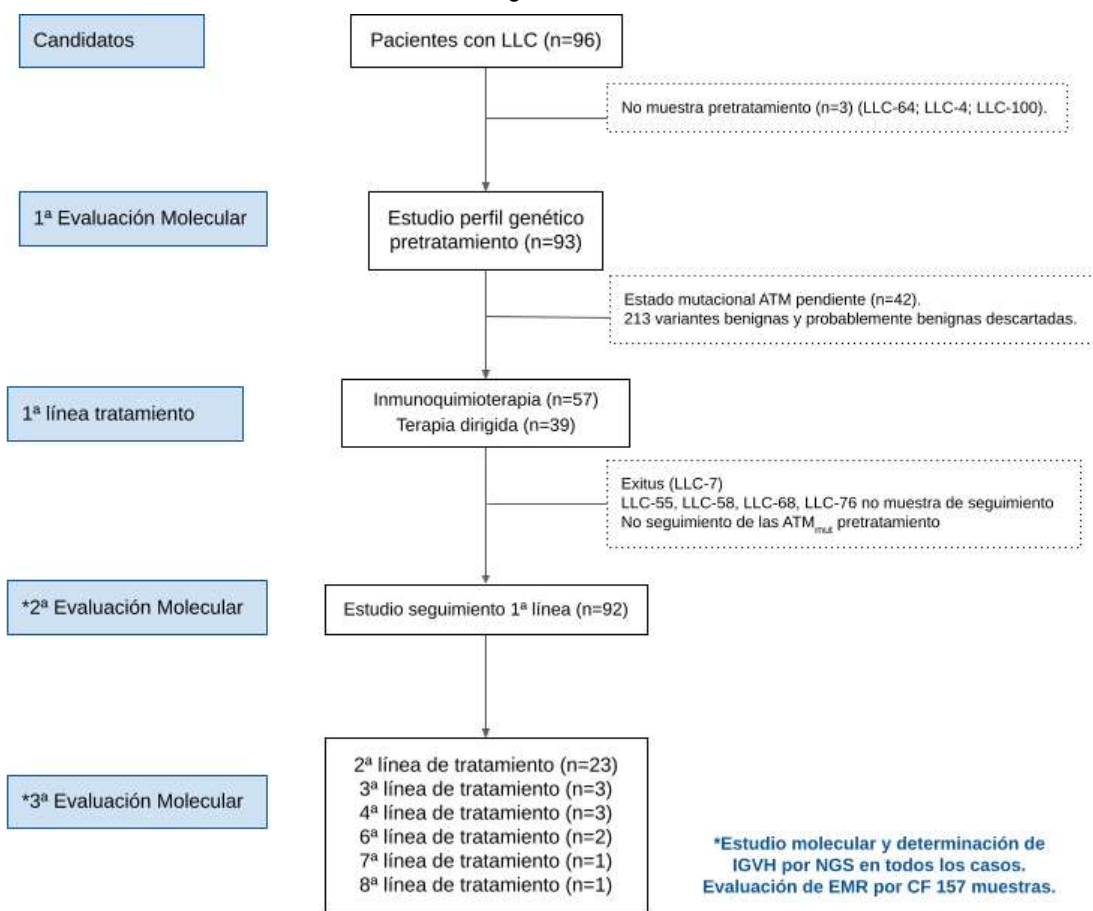
Anexo 1: Figuras 3 Diagrama de barras con la cobertura mínima antes (azul) y después (verde) del reajuste de concentración de cebadores/primers para el panel IBR-R. (Límite de 1000 lecturas marcado en rojo; 95% IC).



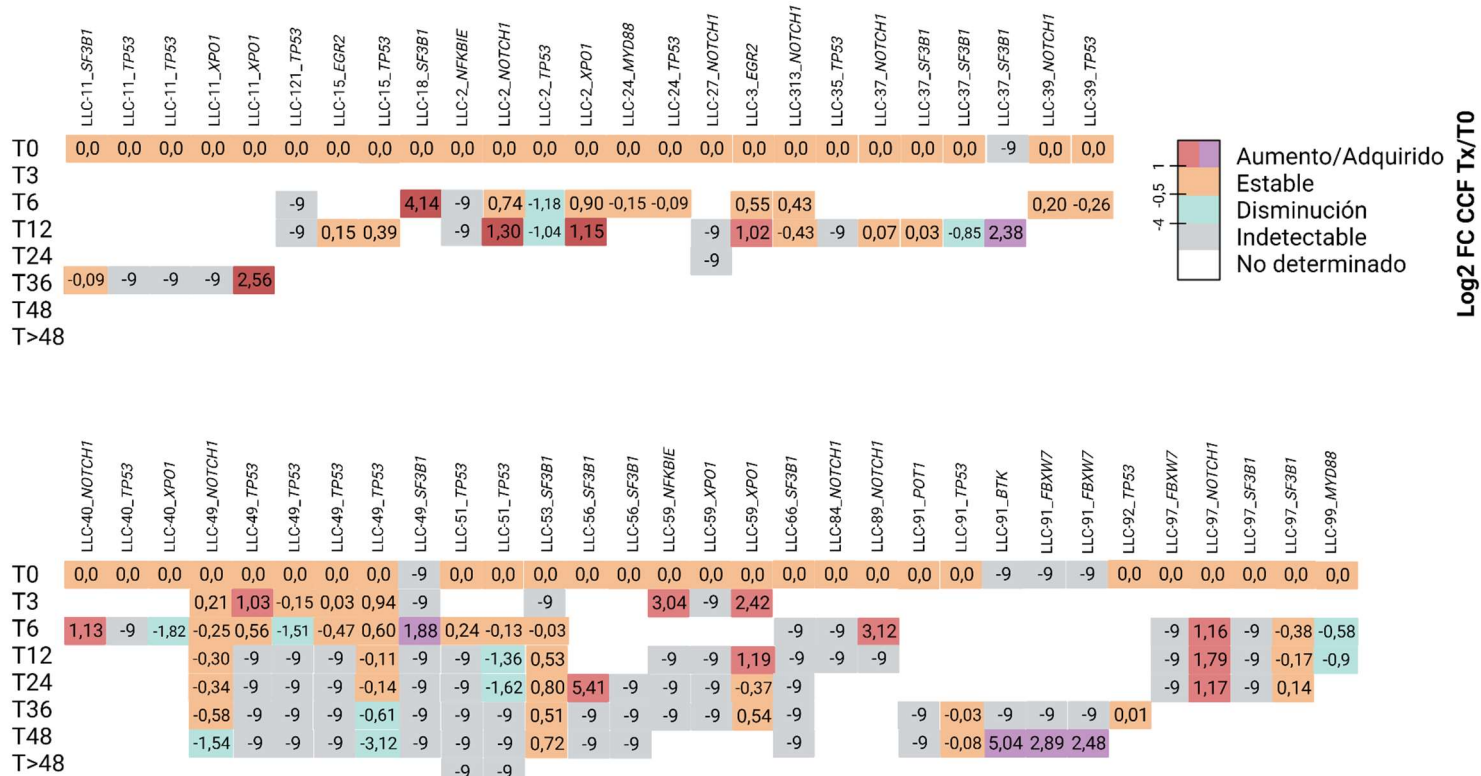
Anexo 1: Figuras 4 Ilustración de la distribución de la cobertura obtenida a lo largo de todas las regiones a estudio en las muestras de seguimiento. a) Diagrama de cajas con la distribución de la cobertura mínima de las muestras de seguimiento, para cada región target. b) Distribución de la cobertura media obtenida para cada región particular. c) Diagrama de barras que muestra el total de casos con un >85% de cada región a estudio cubierta por una cobertura >1000x (azul), >500x (lila), >250x (naranja), >100x (amarillo), >25x (rojo claro), <25x (rojo oscuro). (Estos cut-off han sido extraídos del estudio publicado por Spencer et al. 2014; límite de 1000 lecturas marcado en con línea discontinua roja).



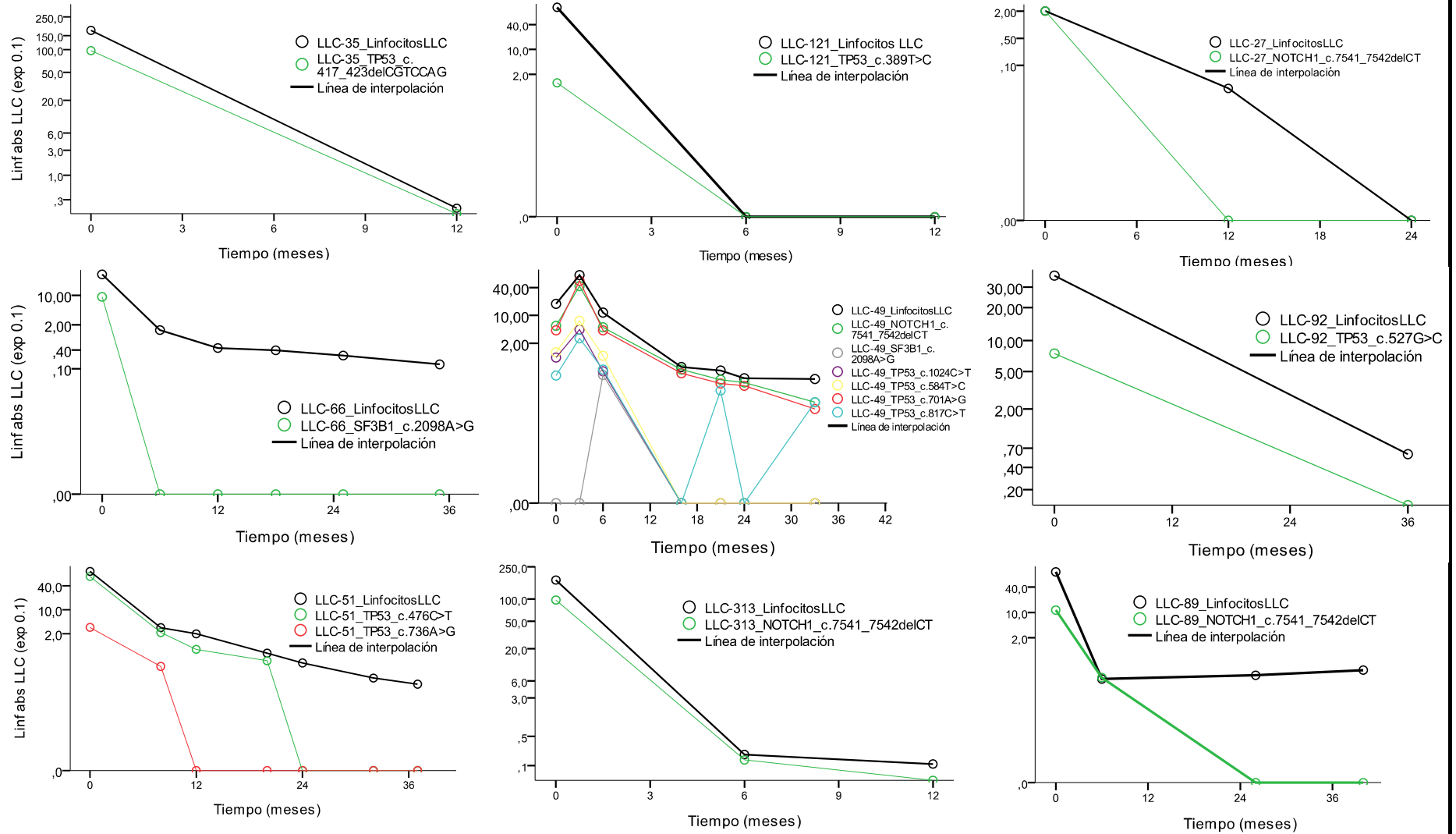
Anexo 1: Figuras 5 Flowchart.



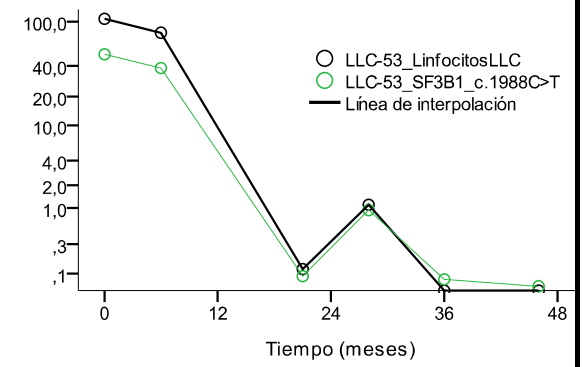
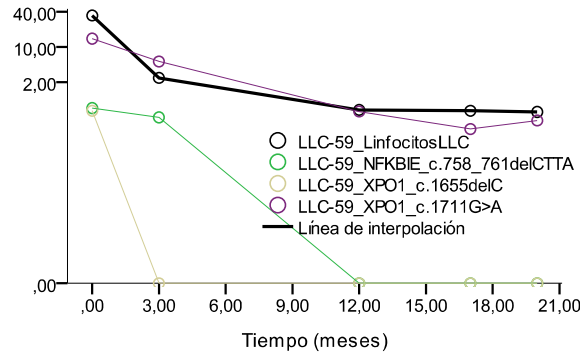
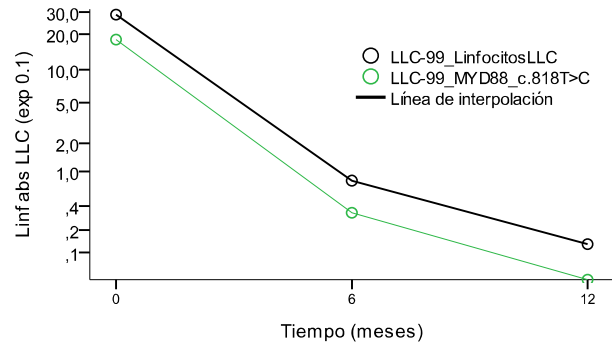
Anexo 1: Figuras 6 Dinámica clonal de las mutaciones detectadas bajo tratamiento con Ibrutinib en pacientes sin tratamiento previo. Heatmap con el CCF log2-fold-change (Log2FC) para cada mutación. El código de color indica la tendencia de cada mutación a lo largo del tiempo: indetectable (<-4), disminución (<-0,5), estable (-0,5 y 1), adquirido y/o aumento (>1).



Anexo 1: Figuras 7 Monitorización de las mutaciones genéticas en función de los tamaños clonales circulantes en SP de los pacientes tratados con Ibrutinib en respuesta global. Gráficas de dispersión en las que los puntos negros representan el recuento linfocitario absoluto LLC. El resto de puntos (distintos colores), marcan la distribución de CCF de cada mutación genética, multiplicado por el número de células LLC circulantes en SP (tendencias representadas con las líneas de interpolación entre puntos, escala potencial exponente 0.1). (Linf abs LLC: linfocitos absolutos LLC unidades $\times 10^9/L$). (No representados LLC-18, LLC-24, LLC-39, LLC-40 al no disponer de muestras de seguimiento tras los 12 meses de tratamiento).



Anexo 1: Figuras 7 (continuación) Monitorización de las mutaciones genéticas en función de los tamaños clonales circulantes en SP de los pacientes tratados con Ibrutinib en respuesta global. Gráficas de dispersión en las que los puntos negros representan el recuento linfocitario absoluto LLC. El resto de puntos (distintos colores), marcan la distribución de CCF de cada mutación genética, multiplicado por el número de células LLC circulantes en SP (tendencias representadas con las líneas de interpolación entre puntos, escala potencial exponente 0.1). (Linf abs LLC: linfocitos absolutos LLC unidades $\times 10^9/L$). (No representados LLC-18, LLC-24, LLC-39, LLC-40 al no disponer de muestras de seguimiento tras los 12 meses de tratamiento).



Anexo 1: Figuras 8 Monitorización de las mutaciones genéticas en función de los tamaños clonales circulantes en SP de los pacientes tratados con Ibrutinib con linfocitosis persistente y en recaída con transformación a Síndrome de Richter. Gráficas de dispersión en las que los puntos negros representan el recuento linfocitario absoluto LLC. El resto de puntos (distintos colores), marcan la distribución de CCF de cada mutación genética, multiplicado por el número de células LLC circulantes en SP. El caso LLC-91 es el único caso con huella genética en recaída a Ibrutinib. (Tendencias representadas con las líneas de interpolación entre puntos, escala potencial exponente 0.1; Linfs abs LLC: linfocitos absolutos LLC unidades $\times 10^9/L$) (No representados LLC-18, LLC-24, LLC-39, LLC-40 al no disponer de muestras de seguimiento tras los 12 meses de tratamiento).

