

Alteraciones genómicas y epigenómicas de las clonas de leucemia linfocítica crónica relacionadas con sus funciones básicas celulares

Víctor Manuel Valdespino-Gómez¹
Patricia Margarita Valdespino-Castillo²

¹ Departamento de Atención a la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Ciudad de México.

² Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

RESUMEN

La leucemia linfocítica crónica es el tipo de leucemia crónica más frecuente en la mayor parte de los países occidentales y, aunque se ha progresado significativamente en el estudio de su fisiopatología integral, su completo entendimiento aún es lejano. En esta revisión fragmentamos el análisis de las alteraciones genómicas y epigenómicas de las clonas de leucemia linfocítica crónica en dos grandes procesos, los correspondientes a las funciones básicas celulares (FBC) y a las funciones especializadas celulares de los linfocitos B transformados. Entre las principales alteraciones genómicas y epigenómicas de las funciones básicas celulares de las clonas de leucemia linfocítica crónica destacan: 1) la recurrencia de cuatro alteraciones en el número de copias de diferentes regiones cromosómicas, 2) la alteración de 20 de los genes conductores principales de su leucemogénesis, 3) perfiles epigenómicos predominantes de hipometilación de dinucleóticos CpG en muchos genes, *enhancers* y secuencias repetitivas, 4) la desregulación transcripcional por la expresión de una gran cantidad de transcritos alternativos, la sobreexpresión de transcritos de algunas vías metabólicas y la menor expresión de transcritos de las vías usadas en el procesamiento del ARN, así como del funcionamiento del proteosoma y ribosoma, y 5) la desregulación de ocho principales vías de señalización intracelulares. En la actualidad, muchas de estas diferentes alteraciones genómicas y epigenómicas que ocurren en las clonas de leucemia linfocítica crónica son motivo de intensa investigación traslacional, en busca de estrategias terapéuticas contra este tipo de leucemia.

Palabras clave: clonas de leucemia linfocítica crónica, alteraciones genómicas, epigenómicas, funciones básicas celulares.

Genomic and epigenomic alterations of chronic lymphocytic leukemia clones in relation to their cellular basic functions

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most frequent type of chronic leukemia in the Western world population. Although there has been a

Recibido: 10 de septiembre 2014

Aceptado: 19 de noviembre 2014

Correspondencia: Dr. Víctor Manuel Valdespino Gómez
vvaldespinog@yahoo.com.mx

Este artículo debe citarse como

Valdespino-Gómez VM, Valdespino-Castillo PM. Alteraciones genómicas y epigenómicas de las clonas de leucemia linfocítica crónica relacionadas con sus funciones básicas celulares. Rev Hematol Mex 2015;16:53-69.

growing development in the study of CLL integral pathophysiology, its complete understanding is far from being achieved. In this review, we have separated the genomic and epigenomic CLL clone alterations in two main processes, corresponding to the basic cellular functions (FBC) and to the specialized cellular functions of the transformed lymphocytes B. Here we highlight the main genomic and epigenomic disorders of FBC in the CLL clones: 1) recurrence of four main alterations in the acquired genomic copy number aberrations, 2) alterations of 20 main driver genes of CLL clone leukemogenesis, 3) predominant epigenomic patterns of CpG dinucleotide hypomethylation of several genes, enhancers and repetitive sequences, 4) transcriptional deregulation by many alternative transcripts, transcript hyperexpression of metabolic signaling pathways, and transcript hypoexpression of signaling pathways for RNA processing, and proteosoma and ribosoma signaling functioning, and 5) deregulation of eight main intracellular signaling pathways. At present, genomic and epigenomic alterations of CLL clones are subject of translational research studies in search to targeted therapeutic strategies.

Key words: CLL clones, genomic, epigenomic alterations, cellular basic functions.

ANTECEDENTES

La leucemia linfocítica crónica es una enfermedad neoplásica que en su evolución participan diferentes grupos de condiciones biológicas. La conjunción de diferentes combinaciones de estas condiciones conduce a que los pacientes con leucemia linfocítica crónica tengan gran heterogeneidad en la manifestación, en la repercusión fisiopatológica en su salud y en la evolución de la enfermedad. En general, los pacientes con leucemia linfocítica crónica tienen riesgo pronóstico favorable en 25%, riesgo intermedio en 38% y riesgo pronóstico adverso en 38% (4% corresponde a muy alto riesgo) en la evolución de la enfermedad; la supervivencia a cinco años de estos tres grupos es de 95, 82 y 19-68%, respectivamente. La determinación de las principales variables moleculares que muestran las clonas tumorales de un paciente particular con

leucemia linfocítica crónica mejora su evaluación integral personalizada.¹

Los tres grandes elementos a considerar en la evaluación clínica del paciente con leucemia linfocítica crónica son: 1) el estado general de salud, 2) las variables moleculares de las clonas de linfocitos neoplásicos relacionadas con sus alteraciones genómicas-epigenómicas y de sus vías de señalización oncogénicas de iniciación y progresión tumoral, y 3) la respuesta antitumoral del paciente contra el efecto de la interacción de estos dos grupos de elementos; lo que se traduce en un estado de activación agresiva o no agresiva de la enfermedad, su progresión en el tiempo y en el ritmo de progresión de la enfermedad. Para calcular el riesgo pronóstico en la evolución de los pacientes con leucemia linfocítica crónica se han propuesto diferentes marcadores, particularmente algunas variables genómicas son

marcadores relevantes en la evolución clínica de la leucemia linfocítica crónica. Por ejemplo, recientemente el grupo alemán GCLLSG propuso una nueva puntuación pronóstica en leucemia linfocítica crónica que varía de 0 a 14 puntos (0 a 2 puntos corresponden a riesgo bajo, 3 a 5, a riesgo intermedio y 6 a 14, a riesgo alto); en ésta, dos anormalidades cromosómicas, la del17p (6 puntos) y la del11q (un punto) se consideraron marcadores pronósticos significativos de la evolución de la enfermedad.^{2,3}

Los avances en las tecnologías de secuenciación del ADN han permitido estudios genómicos y transcriptómicos de mayor cobertura, más rápidos y menos costosos. Las determinaciones modernas de los perfiles genómicos y epigenómicos en las clonas de leucemia linfocítica crónica usando la secuenciación completa de los exomas identifican los marcadores clásicos y los nuevos marcadores que aumentan la información pronóstica, mejoran la selección de los esquemas terapéuticos a prescribir y permiten diseñar y probar nuevos medicamentos dirigidos contra las alteraciones moleculares específicas. En esta revisión se analizan las principales alteraciones genómicas y epigenómicas que modifican el mantenimiento de las funciones básicas de las clonas de leucemia linfocítica crónica, en las que diferentes proteínas y ARNs no codificantes participan en las vías oncogénicas de señalización intracelulares relacionadas con los trastornos de supervivencia y motilidad celulares y con las perturbaciones de la duplicación y reparación del genoma.

Durante el proceso de transformación de las clonas de leucemia linfocítica crónica, además de las alteraciones celulares mencionadas, otras perturbaciones intracelulares y extracelulares relacionadas con el proceso de diferenciación de los linfocitos, y en particular con el proceso de activación del receptor de los linfocitos B

tumorales, contribuyen en la fisiopatología de la leucemia linfocítica crónica; estas alteraciones son complejas y variadas y se analizarán en otra comunicación.

Alteraciones de las clonas de leucemia linfocítica crónica en los procesos celulares de proliferación, apoptosis, mantenimiento de la estabilidad del genoma y motilidad

En general, las clonas de leucemia linfocítica crónica se distinguen por aumento de la proliferación en los órganos linfoides y disminución de la apoptosis en estado de células circulantes. Estas alteraciones celulares están moduladas por los trastornos genómicos y epigenómicos de la transformación celular y por condiciones microambientales.⁴ El estado mutacional somático del locus de la región variable de la cadena de las inmunoglobulinas pesadas (IGHV) de los linfocitos neoplásicos en la leucemia linfocítica crónica ha sido la característica biológica más relevante relacionada con las diferencias de pronóstico en la evolución clínica de estos pacientes. Los pacientes con leucemia linfocítica crónica que muestran porcentajes elevados de clonas IGHV-mutadas (>2%) se asocian con un curso clínico favorable, mientras que los pacientes cuyas clonas no muestran mutaciones del locus IGHV o las muestran en bajo porcentaje (<2%) se asocian con un curso clínico adverso; cada grupo corresponde aproximadamente a la mitad en frecuencia del total de los casos. Aunque el origen de las clonas de la leucemia linfocítica crónica en el proceso de diferenciación de los linfocitos B se ha debatido ampliamente, el consenso de los estudios se inclina a favor de que las clonas de leucemia linfocítica crónica que tengan el gen IGHV no mutado (IGHVnm) se originan de linfocitos *naïves* o inocentes, en la etapa antes de transitar por el centro germinal, mientras que las clonas con IGHV mutado (IGHVm) se originan en los linfocitos de memoria, en etapa después de transitar por el centro germinal; por lo que la

diferente carga mutacional sugiere que estos dos grupos de clones derivan de linfocitos B CD5+ en distintas fases del proceso de diferenciación.⁵⁻⁷ La identificación de la etapa de diferenciación de los linfocitos B en los casos de leucemia linfocítica crónica facilita el entendimiento de su mecanismo de transformación.

En la transformación de los linfocitos B a las clones de leucemia linfocítica crónica están perturbados diversos procesos celulares básicos junto con procesos especializados de diferenciación de los linfocitos B (Figura 1). El marcador más estudiado en este último tipo de procesos es la activación del receptor de los linfocitos B, que orienta indirectamente la subetapa de diferenciación de la que se originan las clones tumorales de la leucemia linfocítica crónica, y que la modulación de sus vías de señalización parece ejercer efectos terapéuticos en los pacientes.⁸ Los principales procesos celulares básicos que sufren alteraciones en la leucemia linfocítica crónica son: 1) los de supervivencia celular que

implican proliferación aumentada y apoptosis disminuida, 2) los procesos relacionados con el mantenimiento de la estabilidad del genoma que incluyen el desarrollo de anomalías genéticas estructurales y cromotripsis y 3) los de motilidad celular que incluyen menor adhesividad y mayor invasividad local y a distancia; estas alteraciones contribuyen a la patogénesis en la iniciación y progresión de la enfermedad. La diversidad en el grado de alteración en estos procesos y en el número de subclonas tumorales afectadas, junto con las correspondientes a las alteraciones en el proceso de diferenciación, conducen a la gran heterogeneidad en los estados de evolución clínica de los pacientes con leucemia linfocítica crónica. En general, cada tipo de alteración en los procesos celulares mencionados está representado por la perturbación de una región topográfica del genoma (aberraciones cromosómicas), de pequeñas áreas codificadoras o reguladoras relacionadas con la transformación celular (oncogenes y genes supresores) o ambas, y de modificaciones funcionales de conjuntos moleculares integrados en vías de señalización intracelulares para el mantenimiento de la homeostasia celular (vías MAPK, etcétera).⁹

Aumento de la proliferación celular. La leucemia linfocítica crónica se distingue por la acumulación de clones de linfocitos B inmaduros detenidas en G0/G1 (99% aproximadamente), mientras que la minoría se mantiene en proliferación (1% aproximadamente), por lo que su índice de proliferación es bajo.¹⁰ La proporción de ambos tipos de clones es variable dependiendo principalmente de la evolución de la enfermedad y se invierte en estadios clínicos avanzados o en estados de resistencia al tratamiento. Los genes que codifican las proteínas y las vías de señalización participantes en la regulación del control del ciclo celular con frecuencia están alterados. De manera concomitante al aumento de la proliferación celular en las clones de la leucemia linfocítica crónica, los

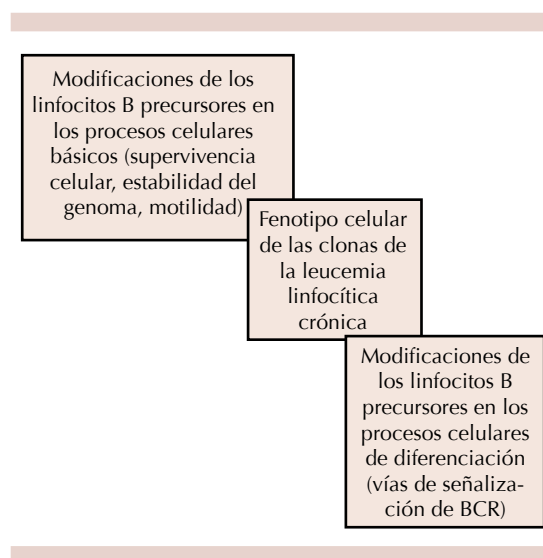


Figura 1. Participación de los procesos celulares básicos y de diferenciación en la aparición de la transformación neoplásica de los linfocitos B a clones de leucemia linfocítica crónica. Elaborada por los autores.

genes y las vías de señalización de las reacciones metabólicas anabólicas son sobreactivadas para generar las biomoléculas requeridas en la duplicación celular, predominantemente a través de la activación de las vías de PI3K/AKT.¹¹

Disminución de la apoptosis. Las clonas de la leucemia linfocítica crónica muestran supervivencia prolongada asociada con defectos en la maquinaria apoptótica, particularmente por una perturbación entre las moléculas pro y antiapoptóticas de la familia BCL2.¹² En leucemia linfocítica crónica frecuentemente ocurre sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas BCL2 y MCL1. La sobreexpresión de BCL2 se ha atribuido a la hipometilación de su promotor génico o por la eliminación o baja regulación de miR-15 y miR-16 (por eliminación de 13q) porque ambos regulan negativamente el nivel postranscripcional de BCL2.¹³ La eliminación del cromosoma 13q14 es la aberración cromosómica adquirida con más frecuencia en la leucemia linfocítica crónica que conlleva a la eliminación del locus del gen supresor tumoral DLEU2/MIR15A/MIR16A.

Aumento de inestabilidad genómica. Aunque en las neoplasias esporádicas la base molecular de la inestabilidad genómica no se conoce totalmente, ésta se asocia con mutaciones de genes supresores tumorales que participan en los procesos de replicación y reparación del ADN, principalmente p53, ATM y CDKN2A (codifica p16INK4A y p14ARF);¹⁴ estos genes se ubican en regiones cromosómicas frecuentemente eliminadas en las clonas de leucemia linfocítica crónica.

En leucemia linfocítica crónica y otras neoplasias esporádicas se ha observado un mecanismo adicional productor de inestabilidad genómica (aberraciones cromosómicas y aCNAs) denominado cromotripsis, que es el proceso por el que se rompen cromosomas cercanos en múltiples fragmentos y su reestructuración se realiza de

manera diferente a la secuencia original.^{15,16} Esta remodelación anómala del genoma puede causar fusiones génicas, eliminación de genes supresores o amplificación de oncogenes, modificando el proceso de progresión tumoral, la evolución pronóstica y la respuesta a los tratamientos.¹⁷ En particular, se considera que una gran cantidad de aberraciones cromosómicas en leucemia linfocítica crónica puede deberse a cromotripsis,¹⁸ porque las translocaciones cromosómicas ocurren en mínima proporción.

Aumento de la migración y disminución del regreso al sitio de origen (homing). Diferentes moléculas que promueven la supervivencia y la proliferación celulares en leucemia linfocítica crónica también participan en la regulación del tráfico de las clonas entre el torrente sanguíneo y los órganos linfoides; de ellas destacan las integrinas CD38, CD49d,¹⁹ CD11a y numerosas quimiocinas y sus receptores correspondientes, que controlan su migración.²⁰ CD38 es una molécula de superficie que funciona como integrador de las señales de proliferación, de migración, quimiotaxis y de *homing*. La migración celular es también modulada por efectos en la adhesión celular debidos a mutaciones de NOTCH1 y de moléculas promotoras de motilidad-invasión y metástasis, como WASF3 y metaloproteasas de matriz extracelular.^{21,22}

Anormalidades cromosómicas y alteraciones genómicas recurrentes

Las variaciones genómicas en las células humanas se deben a cambios en la secuencia nucleotídica relacionadas con las variantes en uno o varios nucleótidos, a pérdida de la heterocigosidad en genes supresores tumorales, a cambios estructurales de la cromatina en el número de segmentos o regiones repetidas en el genoma, al de sus patrones epigenómicos y a los cambios en los perfiles normales de expresión de los genes;^{23,24} las alteraciones en estas

condiciones modifican los fenotipos celulares normales. En leucemia linfocítica crónica las principales alteraciones genómicas estudiadas corresponden a las inserciones y eliminaciones de segmentos cromosómicos (miles a millones de pares de bases), a pequeñas eliminaciones mono y bialélicas y a las mutaciones de genes codificantes de proteínas (Figura 2).

Además de las técnicas clásicas para el estudio del cariotipo humano, como el bandeo cromosómico teñido con Giemsa y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), la cariotipificación virtual o basada en microarreglos (tecnologías de microarreglos de ADN, de SNPs e hibridación genómica comparativa [CGH] junto con la

utilización de nuevos mitógenos que mejoran el crecimiento de las clonas de leucemia linfocítica crónica), y principalmente la secuenciación del ADN de segunda y tercera generación (NGS) acopladas al análisis del número de copias de genes,^{24,25} han permitido identificar los cambios estructurales del genoma con mayor resolución e incluso mutaciones de genes individuales específicos. Se estima que, en promedio, al diagnóstico de la enfermedad, 10 a 12 mutaciones ocurren en regiones codificantes, y dos alteraciones en el número de copias de regiones cromosómicas en las clonas de leucemia linfocítica crónica;^{26,27} cifras comparativamente menores a las de otras neoplasias hematológicas y muy bajas a las que ocurren en los carcinomas epiteliales. Debido a la menor restricción para la realización de los estudios de segunda y tercera generación, en la actualidad es frecuente hacer este tipo de estudios para determinar algunos cambios genómicos asociados con el pronóstico o para valorar el seguimiento clínico de los pacientes, mismos que rastrean la evolución genómica de las clonas tumorales y pueden orientar acerca del uso de estrategias moleculares terapéuticas.

En 60 a 80% de los casos de pacientes con leucemia linfocítica crónica se detectan alteraciones adquiridas en el número de copias de diferentes regiones cromosómicas (aCNAs) recurrentemente afectadas, como del 13q14, trisomía 12, del 11q22-q23, del 17p13 y del 6q (Cuadro 1).^{26,28} Las aCNAs se observan con más frecuencia en los casos de leucemia linfocítica crónica en los que los genes de las inmunoglobulinas pesadas no están mutados. Las aCNAs incluyen pérdidas de regiones cromosómicas (de varias megabases de longitud), duplicación de cromosomas enteros y otros tipos;²⁹ las translocaciones son infrecuentes. Las distintas aCNAs sirven como marcadores de pronóstico en la evolución de la leucemia linfocítica crónica,^{2,3} la mayor parte de las aCNAs eliminan o duplican genes en uno de los cromosomas del par cromosómico (pérdida

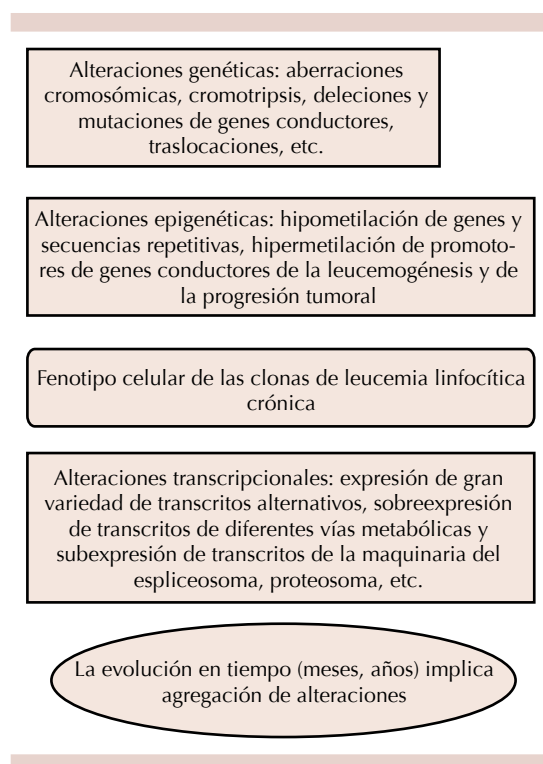


Figura 2. Principales alteraciones genómicas, epigenómicas y transcriptómicas que ocurren en la transformación neoplásica de los linfocitos B a clonas de leucemia linfocítica crónica. Elaboradas por los autores a partir de las referencias consultadas.

Cuadro 1. Principales alteraciones cromosómicas con significación pronóstica en pacientes con leucemia linfocítica crónica

Cromosoma	Región cromosomal	Tipo de alteración	Genes alterados	Porcentaje al diagnóstico	Asociación pronóstica
13	13q14.2	Eliminación tipo 1 Eliminación tipo 2	DLEU1-DLEU2 (Mir15A y Mir16A) RB1	50-60%	Adverso intermedio Adverso severo
14	14q32	Mutación-translocación	IGH	50%	IGHm no adverso IGHnm adverso
12		Trisomía	CDK4, MDM2, MYG6, HIP1R	15%	Intermedio
11	11q22.2,22.3	Eliminación	ATM, BIRC3	12%	Adverso
17	17p13	Eliminación	TP53	5-10%	Adverso severo
2	2p24,16,13	Eliminación-mutación	MYCN, REL, SF3B1	<5%	Adverso
9	9q34.3	Mutación	NOTCH1	<5-10%	Adverso
8	8q24.21, 8p21.3	Mutación	MYC, TNFRSF10A/B	<5%	Adverso

monoalélica) y frecuentemente se asocian con mutaciones, epimutaciones o con la desregulación en su expresión del gen homólogo y con menos frecuencia con pérdida bialélica. De los casos con leucemia linfocítica crónica que muestran aCNAs, más de la mitad de ellos cursan con una o dos aberraciones y 20 a 30% de ellos con más de tres; esta condición se denomina complejidad genómica, corresponde a un factor pronóstico adverso y se asocia con enfermedad agresiva.^{30,31} Los pacientes con complejidad genómica se asocian frecuentemente con condiciones de clonas con IGHVnm, sobreexpresión de CD38 y con múltiples defectos génicos.

La eliminación en la banda 13q14 es la alteración estructural cromosómica más frecuente en los casos con leucemia linfocítica crónica (50-60%) y puede representar un evento temprano en la enfermedad. En esta región se ubican los genes DLEU1 y DLEU2, que codifican los microRNAs Mir15A y Mir16A. Los Mir15A y Mir16A en las clonas de leucemia linfocítica crónica inhiben o regulan negativamente los niveles de los transcriptos BCL-2, ciclinas CCND1 y CCND3 y la cinasa 6 dependiente de ciclina; en su ausencia (eliminación tipo I, de 0.8-1 megabase) son responsables de que las

clonas de leucemia linfocítica crónica favorezcan la proliferación y, de manera concomitante, su resistencia a la apoptosis. Si la eliminación de 13q es amplia (muchas megabases de longitud) puede involucrar la eliminación de RB1 (eliminación tipo II), lo que se asocia con condiciones de pronóstico adverso.^{26,27} Se ha identificado gran variedad de cambios genómicos en los pacientes con eliminación en este segmento cromosómico relacionado con las combinaciones de la pérdida en la longitud del segmento y la pérdida del alelo (corto-bialélico *versus* amplio-monoalélico); por ejemplo, la pérdida de un segmento amplio del cromosoma correspondería a la eliminación de 10 genes, los que, a su vez, modulan a más de otros 50 genes y microRNAs, implicados en los procesos de motilidad, adhesión celular, proliferación y apoptosis.²⁶

La trisomía 12 ocurre en 15% de los casos y se asocia con otras aberraciones cromosómicas que incluyen trisomía 18 y 19, eliminaciones en 14q, 13q, 11q o 17p, translocaciones de IGH y mutaciones en NOTCH1, TP53, FBXW7 y de IGHV. La trisomía 12 se asocia con la sobreexpresión de los genes distribuidos a lo largo del cromosoma, como CDK4, HIP1R, MYF6 y MDM2; este últi-

mo está implicado en la degradación de TP53, mientras que la sobreexpresión de CDK4 parece favorecer la proliferación celular.

La del 11q22-q23 elimina 20 megabases en la mayoría de los casos y afecta al gen supresor tumoral ATM y, con menos frecuencia, a BIRC3 y INSR; la deficiencia de ATM provoca inestabilidad genómica, por defectos en la respuesta reparadora de la rotura de la doble cadena del ADN.²⁴ La del 11q22-23 se ha identificado como un factor pronóstico adverso de la evolución de la leucemia linfocítica crónica.

La del 17p13 ocurre en 5 a 20% de los casos de leucemia linfocítica crónica, donde el gen supresor tumoral p53 se encuentra ubicado, lo que provoca severas alteraciones en el control de la regulación del ciclo y supervivencias celulares. Este tipo de eliminación es una de las eliminaciones cromosómicas más frecuentes adquiridas postratamiento (alteración secundaria) y, en general, su presentación *de novo* se identifica como el factor pronóstico adverso más elevado en la evolución de la leucemia linfocítica crónica.^{2,26} Es frecuente que la eliminación 17p13 monoalélica se asocie con mutaciones de TP53, y con otras múltiples aberraciones que afectan la regulación del ciclo celular, la apoptosis y el mantenimiento de la estabilidad del ADN. En general, los pacientes con leucemia linfocítica crónica y eliminaciones o mutaciones de TP53 no responden a los tratamientos genotóxicos (análogos de purina y alquilantes), por lo que se recomienda administrar otros regímenes que excluyan en su efecto terapéutico la participación de la vía de señalización de TP53 (por ejemplo, flavopiridol, lenalidomida, alemtuzumab, etc.).

La mayor sensibilidad de los microarreglos para el estudio del genoma ha logrado identificar aCNAs de genes específicos en condiciones de microeliminaciones o microganancias de segmentos de kilobases en los brazos cromosomales,

que ayudan a lograr una mejor estratificación de asociación con el nivel de riesgo pronóstico. Al combinar las técnicas clásicas (bandeo cromosómico teñido con Giemsa) con las nuevas tecnologías de exploración genómica como herramientas en la modernización del estudio de las alteraciones en pacientes con leucemia linfocítica crónica, se han detectado traslocaciones cromosomales en 30% de los casos, que involucran al gen IGH, MYC (banda 14q32), al segmento 13q (no provocan modificaciones en el pronóstico) y 17p (se asocian con pronóstico adverso). Asimismo, se han identificado otras aCNAs recurrentes con frecuencias de 1 a 5%, en 6q, 3q26 y 8q24, principalmente.^{24,28}

Los pacientes con leucemia linfocítica crónica y eliminación 17p13 u 11q22-q23 cursan con enfermedad más agresiva, con menor respuesta al tratamiento y menor supervivencia; estas condiciones de enfermedad agresiva pueden explicarse por la eliminación de dos importantes genes supresores tumorales participantes en la regulación del proceso de renovación celular. Los que cursan con trisomía 12 tienen un pronóstico clínico intermedio. Los genes supresores tumorales p53 (17p), ATM/RB (11q), miR15a/16-1 (13q14), junto con los oncogenes NOTCH1, DHH and GLI1 (trisomía 12), MYD88 (13q14), y otros oncogenes participantes en las vías de señalización del BCR participan como genes conductores (*drivers*) en la transformación de los linfocitos B hacia las clonas de leucemia linfocítica crónica.³⁰

La evolución clonal en la progresión de la enfermedad se ha estudiado con la secuenciación del genoma completo, demostrando, en general, que diversas afectaciones de genes conductores de la leucemia linfocítica crónica ocurren en etapas tempranas de aparición de la leucemia linfocítica crónica (por ejemplo, eliminaciones heterogéneas de 13q, trisomía 12 o mutaciones de MYD88 y NOTCH1), y otras diferentes en

etapas tardías (por ejemplo, mutaciones de TP53, ATM, SF3B1 y eliminaciones de 13q), aunque algunas de ellas pueden sobrevenir en ambas etapas (por ejemplo, del17p y del11q).²⁶ En general, la progresión de la enfermedad también coincide con la progresión de las anormalidades cromosómicas en las clonas de leucemia linfocítica crónica, como consecuencia de selección clonal; por ejemplo, en condiciones de clonas de pacientes antes del tratamiento ocurre del17q con frecuencia de 5 a 10%, mientras que en pacientes con recaída o resistentes al tratamiento aumenta a 45% (Cuadro 2). Diferentes estudios han demostrado que en el seguimiento de pacientes con leucemia linfocítica crónica durante más de 11 años, las anormalidades genómicas iniciales aumentan de 17 a 43%, principalmente debidas a la expansión de clonas con anormalidades de riesgo alto de progresión.³¹⁻³³

En los últimos años, los estudios de secuenciación del exoma completo de las clonas de la leucemia linfocítica crónica han identificado más de 1,000 mutaciones somáticas en el genoma de los pacientes; sin embargo, sólo 100 de ellas se han identificado como mutaciones recurrentes que afectan a genes implicados en diferentes vías oncogénicas de señalización

intracelular, que ocurren con frecuencias por debajo de 3 a 5% en los casos individuales. También han concluido que en las clonas de leucemia linfocítica crónica ocurre menos de una mutación, en promedio, por megabase del ADN (baja tasa mutacional) y que en el proceso de transformación de las clonas de leucemia linfocítica crónica interviene una gran heterogeneidad de alteraciones de alelos múltiples de riesgo bajo.^{34,35} Esta gran heterogeneidad genómica y epigenómica ocurre en las clonas de diferentes pacientes, incluso en clonas pertenecientes al mismo paciente,^{33,36} lo que permite entender, en parte, la gran heterogeneidad clínica de los pacientes con leucemia linfocítica crónica. Las diferentes mutaciones recurrentes encontradas en leucemia linfocítica crónica que son conductoras de la iniciación y progresión tumoral incluyen a los genes TP53, ATM, NOTCH1, SF3B1 (*splicing factor 3b subunit 1*), POT1, CHD2, LRP1B, BIRC3, XPO1, FBXW7 y MYD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*)³⁷ y, recientemente, a los genes NRAS, KRAS, HIST1H1E, SAMHD1 y MED12. Las proteínas codificadas por estos genes son componentes importantes de un gran número de vías de señalización intracelulares que participan en el control de ciclo celular, de la

Cuadro 2. Aparición de las principales lesiones genéticas en tres fases de progresión de la leucemia linfocítica crónica

Lesiones genéticas	Aparición al diagnóstico inicial	Aparición en la etapa de resistencia	Aparición en la etapa de transformación a síndrome de Ritter
Eliminación 17q	5-10	45	45
+12	15	-	-
Eliminación ATM	12	25	> 25
Eliminación TP53	5-10	40	60
Mutación NOTCH1	<5-10	25	30
Mutación SF31	<5	25	> 25
Mutación BIRC3	4	25	> 25
Mutación MYD88	3-5	-	-
Mutación MYC	<3	>3	28

Las cifras representan porcentajes.

reparación del daño al ADN (TP53, ATM, POT1 y BIRC3), del procesamiento del ARN mensajero (XPO1 y SF3B1), de la vía NOTCH (NOTCH), de las vías de la respuesta inflamatoria innata (MYD88) y de las vías de modificación de la cromatina (CHD2).

La vía NOTCH participa en la regulación de la supervivencia celular y la apoptosis y junto con SF3B1 en la vía de procesamiento del ARNm; la proteína POT1 es esencial para la estabilidad del telómero.³⁸ En el conjunto de estos genes, algunos funcionan como genes supresores tumorales, como TP53 (localizado en el cromosoma 17p) y BIRC3 y ATM (localizados en el cromosoma 11q); la eliminación de estas regiones conlleva a una leucemia linfocítica crónica con pronóstico adverso.

El número y patrón de mutaciones somáticas es diferente en los casos de leucemia linfocítica crónica con o sin mutaciones del gen IGHV, debido probablemente a efectos de cosegregación génica. En casos con IGHV mutado, el perfil de mutaciones se asocia con el de del13q, MYD88 y CHD2, mientras que en los casos con IGHV no mutado el perfil de mutaciones se asocia con el de tris12-NOTCH1, del11q-SF3B1, ATM y del17p-TP53, lo que sugiere que las diferencias en el comportamiento clínico entre estos dos grupos de pacientes están relacionadas con la activación de diferentes mecanismos moleculares;³⁹ en particular, se han identificado mutaciones frecuentes en los genes de la maquinaria del procesamiento del ARN (U2 snRNPsplíceosome).⁴⁰

La incidencia en porcentaje de las anomalías cromosómicas y de las mutaciones conductoras en el diagnóstico de los pacientes con leucemia linfocítica crónica es, aproximadamente, de 50% en del13q, 15% en tris12, 15% en ATM, 5 a 10% en TP53, 10% en NOTCH1, 5 a 10% en SF3B1, 4% en BIRC3 y 3 a 5% en MYD88. En general,

estos porcentajes aumentan progresivamente en condiciones del curso de la enfermedad, resistencia o de su transformación a síndrome de Ritter (Cuadro 1).^{27,41} El análisis comparativo de los cambios genómicos que suceden en el curso de la enfermedad, en los grupos de pacientes con diferente estado mutacional del gen IGHV y con otros diferentes comportamientos clínicos en la evolución de la enfermedad, permite mejorar el entendimiento de los mecanismos biológicos que suceden en la leucemia linfocítica crónica.³¹ Muchos de los nomogramas de pronóstico actuales de los pacientes con leucemia linfocítica crónica se basan en las alteraciones genómicas, lo que aumenta su precisión; no obstante, seguirán mejorando progresivamente a partir de la aplicación de tecnologías de determinaciones con mayor resolución.

Alteraciones epigenómicas

En este decenio el mejor entendimiento del funcionamiento del genoma a partir de la identificación de sus perfiles epigenómicos y de miles de regiones reguladoras de la transcripción se ha logrado a través del trabajo de varios consorcios internacionales interesados en descifrar la función del genoma humano, entre los que destaca el proyecto de la Enciclopedia de los Elementos del ADN (ENCODE).^{42,43} El proyecto ENCODE ha identificado las regiones promotoras (regiones reguladoras cercanas) y amplificadoras o *enhancers* (regiones reguladoras lejanas), mapas de unión de los diferentes factores de transcripción al ADN, de la metilación del ADN, de los cambios covalentes de las histonas y de la organización de la cromatina que regulan la transcripción, de la actividad de los *enhancers*, de la duplicación y reparación del ADN y de la segregación cromosomal. Los mapas epigenómicos definen qué partes del genoma se encuentran activos o inactivos para transcribir y permiten distinguir los patrones de tipos celulares específicos en condiciones fisiológicas y en condiciones de enfermedad. En los últimos

años se ha identificado una gran cantidad de alteraciones epigenómicas que participan en la aparición y progresión del cáncer.⁴⁴

Se han encontrado diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas en la patogénesis molecular de la leucemia linfocítica crónica (Figura 2). Las alteraciones epigenéticas, como las anormalidades en las histonas y en los patrones de metilación en el ADN, producen indirectamente alteraciones en el patrón de expresión de los genes. La metilación del ADN ha sido el marcador epigenético estudiado más ampliamente en las fases de iniciación y progresión tumoral y la desregulación del mantenimiento de sus patrones fisiológicos induce alteraciones transcripcionales en genes codificantes de proteínas y en genes codificantes de ARNs reguladores. La identificación de los patrones de metilación en las diferentes regiones del genoma humano y su asociación con diferentes enfermedades crónico-degenerativas es un área de intensa investigación de los últimos años y sus resultados son aún incipientes.

En la leucemia linfocítica crónica se han identificado mutaciones múltiples en los genes que regulan los cambios epigenéticos de los linfocitos B, junto con alteraciones en los patrones de metilación de los dinucleótidos CpG ubicados en los promotores que regulan la expresión génica. En general, las células transformadas tienen hipometilación en los cuerpos de los genes, acompañadas de hipermetilación localizada en promotores génicos junto con incremento en la expresión de la ADN-metiltransferasa.⁴⁵ Los perfiles de metilación de promotores de genes y de ARNs no codificantes, implicados en la patobiología de la leucemia linfocítica crónica difieren en los subgrupos de los pacientes con distintas condiciones de pronóstico. Entre los principales genes con patrones alterados, destacan BCL2, TCL1, DAPK1, LPL, ZAP70, NOTCH1 y genes reguladores de otras vías de señalización de los linfocitos B.

El análisis epigenético de las clonas de leucemia linfocítica crónica ha mostrado hipometilación global de los genes (exones e intrones) y particularmente de secuencias repetitivas, como ALU, LINE y SAT α e hipermetilación de regiones promotoras; cambios que se mantienen estables desde las fases tempranas de la patogénesis de la enfermedad. Estos cambios promueven la inestabilidad genómica (defectos en la reparación del ADN, cromotripsis), la activación de algunos proto-oncogenes (BCL2, MDR1 y TCL1) y el silenciamiento de genes supresores tumorales, como TP53, E-caderina (CHD1), WISP3, VHL, ABI3 y DAPK1. Otras alteraciones en la metilación del ADN modifican la expresión de genes relacionados con la evolución clínica de la enfermedad, como ZAP70, LPL, CLLU1 y NOTCH1, con genes participantes en la supervivencia y proliferación celular como MYB, LEF1, SANRP2,-4, con genes participantes como factores de transcripción, como TWIST2 y HOXA4, que funcionan como reguladores epigenéticos (HDAC4/HDAC9), o que regulan la expresión de ARNs no codificantes, como miRNAs (-34a, -129, -708).^{46,47}

En la aparición de la leucemia linfocítica crónica, algunas vías de señalización, como WNT, las vías de reparación del ADN y otras más son afectadas por cambios epigenéticos. En la vía WNT, la hipermetilación de sus genes inhibidores es un factor importante para la iniciación tumoral. Más de 100 diferentes genes son hipermetilados en las clonas de leucemia linfocítica crónica en comparación con los linfocitos B normales.⁴⁷ Las alteraciones en los patrones de algunos de estos genes ocurren asociados con condiciones, como la baja o alta expresión de CD38, el estado de activación inmunológica de los linfocitos B, o el estado mutacional de IGHV.

Los genes LPL, ZAP70, CRY1, SPG20, CLLU1 o LAG1 se expresan diferencialmente en clonas de leucemia linfocítica crónica que sobreviven

con IGHV mutado y IGHV no mutado; y estos patrones de expresión de los dos subtipos parecen estar relacionados con el origen supuesto de las clonas tumorales. En las clonas de IGHVnm los genes de las vías MAPK y NF- κ B implicados en la proliferación celular están mayormente hipermetilados que en las clonas de IGHVm. En años recientes algunas investigaciones que usaron como herramienta de estudio los microarreglos de ADN de oligonucleótidos de alta densidad que exploran más de 485,000 sitios de metilación caracterizando el ADN-metiloma de los genes de ambos subgrupos.

Kulis y colaboradores⁴⁸ compararon el metiloma de 139 pacientes con leucemia linfocítica crónica con linfocitos normales y encontraron semejanzas del perfil epigenómico entre las clonas de leucemia linfocítica crónica-IGHVnm con el correspondiente de los linfocitos B inocentes, y entre las clonas de leucemia linfocítica crónica-IGHVm con el correspondiente de los linfocitos B de memoria. Asimismo, identificaron marcada hipometilación en diferentes genes y *enhancers*, participantes en las vías de señalización de la activación del receptor de linfocitos B, de NF- κ B, de las vías de activación dependientes de calcio, de las interacciones de las citocinas con sus receptores, de la coestimulación del linfocito T, así como en los genes ASXL1, BRAF, CDH23, EGR2, FAM117A, PHC2, POT1 y SF3B1. De acuerdo con su perfil epigenómico de hipometilación de los genes (exones e intrones) y de sus *enhancers*, demostraron la factibilidad de identificar tres tipos de clonas de leucemia linfocítica crónica: las clonas originadas en linfocitos *naïves*, las correspondientes a linfocitos B de memoria y un grupo intermedio; el primer grupo se asoció con las clonas con genes IGHVnm y evolución clínica con supervivencias bajas, el grupo con epimarcas de linfocitos B de memoria se asoció con clonas con genes IGHVm y evolución clínica con supervivencias elevadas, y en el grupo intermedio se identificaron epimarcas parecidas

a las de los de leucemia linfocítica crónica-linfocitos B de memoria, cuya evolución clínica mostró supervivencias ligeramente menores al de los casos con linfocitos B de memoria. En la continuación de ese estudio, Queiros y colaboradores desarrollaron un sistema simplificado de clasificación clínica-biológica de la evolución de los pacientes con leucemia linfocítica crónica, usaron cinco marcadores epigenéticos (tres localizados en el cuerpo de genes, uno en una región promotora y el otro en una región intergénica del cromosoma 14) de repercusión pronóstica y predictiva elevada.⁷

Las diferentes áreas de análisis de la epigenómica, como los mecanismos de metilación del ADN, los de las modificaciones de las histonas, los de la dinámica de la estructura de la cromatina y los de las modificaciones en la arquitectura nuclear, son motivo de investigación en estos cinco últimos años y para su estudio requieren tecnologías genómicas avanzadas; sus resultados aumentarán el entendimiento de los procesos de regulación nuclear que incluyen *splicing*, replicación, respuesta al daño de ADN, plegamiento y empaquetamiento de la cromatina y el perfil de los patrones de expresión en los diferentes tipos de células.⁴⁹

Las señales bioquímicas de las células microambientales de los órganos linfoides secundarios modifican en términos epigenéticos las clonas de leucemia linfocítica crónica a su paso, particularmente en los cambios en la metilación del ADN en las regiones promotoras y *enhancers*, lo que conduce a la producción de diferentes transcritos por *splicing* alternativo y, secundariamente, modificaciones en la activación de las vías de señalización oncogénica y fenotipos celulares más agresivos.⁴⁶

Caracterización del transcriptoma. En la actualidad el proceso normal de transcripción de los genes se conocer mejor, implica una abundante cantidad de elementos funciona-

les y una compleja secuencia de reacciones moleculares. Muchas variaciones estructurales normales y anormales del genoma influyen en la expresión de los genes. Las variaciones en los perfiles de la transcripción global del genoma se identifican usando los métodos de los microarreglos de expresión del genoma y, recientemente, mediante las tecnologías de secuenciación del ARN; esta última permite la cuantificación de los transcritos, identifica sus variantes y las copias expresadas. Los microarreglos de expresión han identificado posibles candidatos participantes en la patogénesis de la leucemia linfocítica crónica. Una parte del proyecto ENCODE, el GENCODE, demostró que 75% del ADN humano es capaz de transcribir, incluso en las regiones correspondientes a ARNs largos y de los seudogenes (regiones intrónicas e intergénicas).^{43,50}

Miles de cambios transcripcionales diferenciales en genes que codifican proteínas, ARN-no codificantes y seudogenes se han detectado entre los linfocitos B normales y las clonas de leucemia linfocítica crónica. Entre los trastornos transcripcionales encontrados en leucemia linfocítica crónica destacan las alteraciones de los patrones de micro-ARNs participantes, del de las isoformas de endonucleasas, del de los componentes del espliceosoma, del de los componentes de la transportación del ARN, etc., que en conjunto conlleva la expresión de una gran variedad de transcritos alternativos (Figura 2).

Hace poco, Ferreira y su grupo⁵¹ caracterizaron el panorama transcripcional diferencial de elevada resolución de 98 pacientes con leucemia linfocítica crónica, usando como metodología de análisis la secuenciación de sus ARNs. Encontraron miles de diferencias entre los linfocitos B normales y las clonas tumorales; en general, en leucemia linfocítica crónica los genes implicados en las vías metabólicas mostraron sobreexpresión, mientras que los genes relacionados con el

funcionamiento del espliceosoma, proteosoma y ribosoma mostraron baja regulación; además, se observó bloqueo de la represión de los elementos genéticos transponibles (trasposones) –que en términos fisiológicos se encuentran reprimidos–, lo que permitió la expresión de una gran variedad de patrones de transcritos alternativos. En este estudio, los patrones de los transcritos se identificaron en dos subgrupos C1 y C2. En el análisis multivariable de los casos con etapas clínicas A y B las variables significativas relacionadas con la evolución de los pacientes fueron los perfiles C1/C2 y el estado mutacional de IGHV. Asimismo, se observó que los patrones de expresión de las clonas C1 y C2 pueden ser influidos por las células del microambiente de los ganglios linfáticos.

Desregulación de las vías de señalización intracelulares

En general, se ha identificado que las diferentes proteínas codificadas por los genes mutados en las células de leucemia linfocítica crónica de pacientes antes del tratamiento participan en ocho principales vías de señalización intracelular: NOTCH, de la señalización del receptor de linfocitos B (que incluye las vías de PI3K, y NF- κ B), de la señalización de las vías de la respuesta inmunitaria innata (receptores tipo Toll-TRLs), de la vía WNT, de las vías que participan en la reparación del ADN dañado, del control del ciclo celular, en el procesamiento del ARN, en las que regulan las modificaciones de la cromatina, y las vías que activan algunas citocinas (JAK/STAT). La activación oncogénica de estas vías de señalización intracelulares provoca la leucemogénesis y su progresión en la leucemia linfocítica crónica.^{33,52} La vía NF- κ B enlaza la activación de la respuesta innata del sistema inmunológico con los procesos asociados con la oncogénesis, como la proliferación celular, evasión de la apoptosis e invasión local y a distancia⁵³ y, en particular, su vía no canónica o no clásica es la más importante

en la organogénesis linfoide y está activada en las clonas de leucemia linfocítica crónica en la médula ósea.⁵⁴ La activación de la vía NF- κ B incrementa el riesgo de padecer cáncer y acelera su progresión. La activación de las vías oncogénicas de la leucemia linfocítica crónica implica, por lo menos, la participación de 20 moléculas codificadas por genes conductores.

La vía NOTCH es activada por el factor de transcripción NOTCH1, que regula diferentes vías de señalización relacionadas con el control del crecimiento celular. Las mutaciones de NOTCH1 ocurren preferentemente en los casos de leucemia linfocítica crónica con IGHV no mutado, se asocian con la trisomía 12 y los pacientes en estas condiciones cursan con pronóstico adverso.⁵² SF3B1 es uno de los reguladores del proceso de corte y empalme alternativo del ARNm de los genes que controlan la progresión de la célula en el ciclo celular y la supervivencia, y BIRC3 a través de TRAF2 y TRAF3 regulan negativamente a MAP3K14 en la vía NF- κ B; las mutaciones de BIRC3 favorecen la activación constitutiva de la vía NF- κ B. Las mutaciones de SF3B1 y de BIRC3 se asocian con reducción en la supervivencia de los pacientes, independientemente de otros factores clínicos o biológicos de riesgo.²⁷

En la progresión y resistencia de los pacientes con leucemia linfocítica crónica, el patrón de activación de las vías de señalización oncogénicas aumenta por un incremento en la desregulación del estado mutacional de TP53 o por aumento del estado mutacional del conjunto de genes NOTCH1, SF3B1 y BIRC3. En particular, en condiciones de transformación de la leucemia linfocítica crónica a síndrome de Richter, se ha observado el aumento del estado mutacional de TP53 a 50-60%, de NOTCH1 a 30% y de MYC a 20% en las clonas tumorales, lo que conlleva a desarrollar el fenotipo de linfoma difuso de células grandes.²⁷

Implicaciones clínicas de los perfiles genómicos y epigenómicos de las clonas de leucemia linfocítica crónica

Una gran cantidad de estudios ha demostrado que los perfiles genómicos y epigenómicos de las clonas tumorales en los pacientes con leucemia linfocítica crónica repercuten significativamente en la evolución clínica de la enfermedad. Así, el análisis de cohortes de pacientes con leucemia linfocítica crónica no tratados demostró que cuatro mutaciones en genes conductores de la transformación se asocian con importantes variaciones en el pronóstico, particularmente SF3B1, NOTCH1, BIRC3 y TP53.³⁶ En otros estudios también se demostró este tipo de asociaciones en pacientes que recibieron tratamientos específicos, por ejemplo, con peor pronóstico asociado con mutaciones de TP53 reportados del grupo alemán del ensayo CLL4 que recibieron fludarabina con y sin ciclofosfamida.⁵⁵ En otro estudio se determinó, incluso, que algunas mutaciones conductoras de la progresión o de la resistencia de la leucemia linfocítica crónica ocurrían en escasas subclonas antes del tratamiento.³³

En la actualidad sólo las eliminaciones de 17p y las mutaciones de TP53 son elementos de decisión en la modificación de los criterios terapéuticos en leucemia linfocítica crónica, debido a que los pacientes con mutaciones de TP53 tienen alta probabilidad de no responder a los esquemas de tratamiento convencionales de inmunoterapia; por ello, es recomendable que estos pacientes reciban regímenes alternativos de tratamiento que superen esta resistencia a la aplicación de tratamientos convencionales.⁵⁶ Asimismo, la elevada incidencia de mutaciones somáticas en diferentes genes indica la participación de varias vías de señalización oncogénicas e induce a investigar su inhibición como blancos terapéuticos antitumorales. Algunos medicamentos en desarrollo contra la leucemia linfocítica crónica incluyen: inhibidores o moduladores de

las vías NOTCH, de las del procesamiento del ARNm, de la vía NF- κ B, del de la telomerasa,⁵⁷⁻⁵⁹ junto con los que interfieren en las vías de la hipermutación somática y en las vías del receptor de los linfocitos B.^{60,61}

CONCLUSIONES

El análisis genómico y epigenómico de las alteraciones ocurridas en las clonas de leucemia linfocítica crónica permite mejorar el entendimiento de la fisiopatología en el desarrollo y progresión tumoral. La fisiopatología de la leucemia linfocítica crónica es menos compleja en el número de alteraciones genómicas y epigenómicas que con la de otras neoplasias hematológicas y no hematológicas; sin embargo, entenderla integralmente aún es lejano. Entre las principales alteraciones genómicas y epigenómicas de las clonas de la leucemia linfocítica crónica destacan la identificación de cuatro alteraciones en el número de copias de diferentes regiones cromosómicas, de 20 genes conductores principales de su leucemogénesis, los perfiles epigenómicos predominantes de hipometilación de dinucleótidos CpG en muchos genes, *enhancers* y en secuencias repetitivas, la desregulación transcripcional de gran cantidad de transcritos alternativos, sobreexpresión de transcritos de algunas vías metabólicas y menor expresión de transcritos de las vías usadas en el procesamiento del ARN, y funcionamiento del proteosoma y ribosoma, y la desregulación de ocho principales vías de señalización intracelulares.

Muchas de estas diferentes alteraciones genómicas y epigenómicas que ocurren en las clonas de leucemia linfocítica crónica son motivo de intensa investigación traslacional, en busca de estrategias terapéuticas contra este tipo de leucemia. La investigación biomédica progresiva en estas áreas permitirá avanzar en el entendimiento

de la fisiopatología molecular integral de la leucemia linfocítica crónica.

REFERENCIAS

1. Valdespino GVM. Leucemia linfocítica crónica de linfocitos B: un modelo personalizado de valoración clínica y molecular. *Rev Hematol Mex* 2014;15:103-121.
2. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, et al. Development of comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014;124:49-62.
3. Tam CS, Seymour JF. A new prognostic score for CLL. *Blood* 2014;124:1-2.
4. Deaglio S, Vaisitti T, Zucchetto A, Gattei V, Malavasi F. CD38 as a molecular compass guiding topographical decisions of chronic lymphocytic leukemia cells. *Sem Cancer Biol* 2010;20:416-423.
5. Hamblin TJ, Davis Z, Gardomier A, Oscler DG, Stevenson FK. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-1854.
6. Klein U, Dalla-Favera R. New insights into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Sem Cancer Biol* 2010;20:377-383.
7. Queirós AC, Villamor N, Clot G, Martínez-Trillos A, et al. A B-cell epigenetic signature defines three biological subgroups of chronic lymphocytic leukemia with clinical impact. *Leukemia* 2014;1038.
8. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118:4313-4320.
9. Chuang HY, Rassenti L, Salcedo M, Licon K, et al. Subnetwork-based analysis of chronic lymphocytic leukemia identifies pathways that associate with disease progression. *Blood* 2012;120:2639-2649.
10. Herishanu Y, Katz BZ, Lipsky A, Wiestner A. Biology of chronic lymphocytic leukemia in different microenvironments: clinical and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013;27:173-206.
11. Palacios F, Abreu C, Prieto D, Morande P, et al. Activation of the PI3K/AKT pathways by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. *Leukemia* 2014;29:115-125.
12. Capitani N, Baldari CT. The Bcl-2 family as a rational target for the treatment of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Curr Med Chem* 2010;17:801-811.
13. Fegan C, Pepper C. Apoptosis deregulation in CLL. *Adv Exp Med Biol* 2013;792:151-171.
14. Negrini S, Gorgoulia VG, Halazonetis TD. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:220-228.

15. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang E, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011;44:27-40.
16. Pellestor F, Gatinois V, Puechberty J, Genevieve D, Lefort G. Chromothripsis, an unexpected novel form of complexity for chromosomal rearrangements. *Med Sci Paris* 2014;30:266-273.
17. Kloosterman WP, Koster J, Molenaar JJ. Prevalence and clinical implications of chromothripsis in cancer genomes. *Curr Opin Oncol* 2014;26:64-72.
18. Bassaganyas L, Bea S, Escaramis G, Tornador C, et al. Sporadic and reversible chromothripsis in chronic lymphocytic leukemia revealed by longitudinal genomic analysis. *Leukemia* 2013;27:2376-2379.
19. Brachtel G, Piñon HJ, Greil R, Hartmann TN. The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 2014;93:361-374.
20. Han TT, Fan L, Li JY, Xu W. Role of chemokines and their receptors in chronic lymphocytic leukemia: function in microenvironment and targeted therapy. *Cancer Biol Ther* 2014;15:3-9.
21. Teng Y, Ross JL, Cowell JK. The involvement of JAK-STAT3 in cell motility, invasion and metastasis. *JAKSTAT* 2014;3:28086.
22. Riches JC, O'Donovan CJ, Kingdon SJ, McClanahan F, et al. Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells exhibit upregulation of integrin signaling that is modulated by NOTCH1 mutations. *Blood* 2014;123:4101-4110.
23. Haraksingh RR, Snyder MP. Impacts of variation in the human genome on gene regulation. *J Mol Biol* 2013;425:3970-3977.
24. Malek SN. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 2013;32:2805-2817.
25. Puiggros A, Puigdecane E, Salido M, Ferrer A, et al. Genomic arrays in chronic lymphocytic leukemia routine clinical practice: are we ready to substitute conventional cytogenetics and fluorescence *in situ* hybridization techniques? *Leuk Lymphoma* 2013;54:986-995.
26. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Bio Med Res Int* 2014;2014:ID435983.
27. Gaidano G, Foa R, Daiia-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2012;122:3432-3438.
28. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-1916.
29. Rodriguez Vicente AE, Diaz MG, Hernandez-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous. *Cancer Genet* 2013;206:49-62.
30. Ouillette P, Malek S. Acquired genomic copy number aberrations in CLL. *Adv Exp Med Biol* 2013;792:47-86.
31. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Rossi D, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2014;10:1038.
32. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, Berner A, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* 2007;92:1242-1245.
33. Landau DA, Carter SL, Stojanov P. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013;152:714-726.
34. Improgo MR, Brown JR. Genomic approaches to chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2013;27:157-171.
35. Quesada V, Ramsay AJ, Rodriguez D, Puente XS, et al. The genomic landscape of chronic lymphocytic leukemia: clinical implications. *BMC Medicine* 2013;11:124.
36. Gruber M, Wu CJ. Evolving understanding of the CLL genome. *Sem Hematol* 2014;51:177-187.
37. Schnaiter A, Mertens D, Stilgenbauer S. Genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lab Med* 2011;31:649-658.
38. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M, Conde L, et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2013;45:526-530.
39. Martinez-Trillos A, Quesada V, Villamor N, Puente XP, et al. Recurrent gene mutations in CLL. *Adv Exp Med Biol* 2013;792:87-107.
40. Ramsay AD, Rodriguez D, Villamor N, Kwarcia A, et al. Frequent somatic mutations in components of the RNA processing machinery of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2013;27:1600-1603.
41. Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A, Cazorla M, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2013;27:1100-1106.
42. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;489:57-74.
43. Siggins L, Ekwall K. Epigenetics, chromatin and genome organization: recent advances from the ENCODE project. *J Int Med* 2014;276:201-214.
44. Hattori N, Ushijima T. Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;1016.
45. Ziller MJ, Gu H, Muller F, Donaghey J, et al. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 2013;500:477-481.
46. Martin-Subero JI, Lopez-Otin C, Campo E. Genetic and epigenetic basis of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol* 2013;20:362-368.

47. Cahill N, Rosenquist R. Uncovering the DNA methylome in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics* 2013;8:138-148.
48. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queiros AC, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genet* 2012;44:1236-1242.
49. Rivera CM, Ren B. Mapping human epigenomes. *Cell* 2013;155:39-52.
50. Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, et al. GENCODE: the reference human genome annotation for the ENCODE Project. *Genome Res* 2012;22:1760-1774.
51. Ferreira PG, Jares P, Rico D, Gomez-Lopez G, et al. Transcriptome characterization by RNA sequencing identifies a major molecular and clinical subdivision in chronic lymphocytic leukemia. *Genome Res* 2014;24:212-226.
52. Li PP, Wang X. Role of signaling pathways and miRNAs in chronic lymphocytic leukemia. *Chin Med J* 2013;126:4175-4182.
53. Naugler WE, Karin M. NF- κ B and cancer. In: Gelman EP, Sawyers CL, Rauscher FJ III. *Molecular Oncology*. Cambridge, UK. Cambridge University Press 2014:336-352.
54. Xu J, Zhou P, Guo F. Function of alternative NF- κ B activity in B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2014;35:40-45.
55. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010;28:4473-4479.
56. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute. Working Group 1996 Guidelines. *Blood* 2008;111:5446-5456.
57. Groth C, Fortini ME. Therapeutic approaches to modulating notch signaling: current challenges and future prospects. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23:465-472.
58. Bonnal S, Vigevari L, Valcarcel J. The spliceosome as a target of novel antitumor drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:847-859.
59. Ruden M, Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat Rev* 2013;39:444-456.
60. Robak T, Robak P. BCR signaling in chronic lymphocytic leukemia and related inhibitors currently in clinical studies. *Int Rev Immunol* 2013;32:358-376.
61. Brown JR, Porter DL, O'Brien SM. Novel treatments for chronic lymphocytic leukemia and moving forward. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2014;317-325.