



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**ESTUDI DE LES CARACTERÍSTIQUES CLÍNIC-BIOLÒGIQUES DE LA  
LIMFOCITOSI B MONOCLONAL, LA FREQUÈNCIA I SIGNIFICAT PRONÒSTIC DE  
LES ALTERACIONS CITOGENÈTIQUES ASSOCIADES I LA SEVA RELACIÓ AMB  
LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

**Tesi doctoral**

**Ines Hernández Rodríguez**

**Directors**

**José Tomás Navarro Ferrando**

**Jordi Juncà Piera**

**Josep Maria Ribera Santasusana**

**Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Medicina.**

**Programa de doctorat: Doctorat en Medicina**

**Any 2017**



## **AGRAÏMENTS**

A tot el servei d'hematologia, perquè sou una guia i un recolzament per a les activitats laborals i per les de la vida.

Al meu pare, a la meva família i amics, per preguntar-me, per escoltar-me.

A la meva mare i germanes. Sense elles res seria igual.

Molt especialment al Roger i al Teo. Per omplir-me la vida.

## **ÍNDEX**

### **AGRAÏMENTS**

### **ABREVIACIONS**

**1**

### **I. INTRODUCCIÓ**

**3**

### **II. LIMFOCITOSI B MONOCLONAL**

**5**

#### **a. DEFINICIÓ I SUBTIPUS**

#### **b. EPIDEMIOLOGIA DE LA LBM**

#### **c. CARACTERÍSTIQUES BIOLÒGIQUES DE LA LBM**

##### **i. LBM de baix i elevat recompte**

##### **ii. LBM d'alt recompte i LLC estadi Rai 0**

##### **iii. LBM ganglionar**

##### **iv. LBM no LLC**

#### **d. HISTÒRIA NATURAL DE LA LBM. RISC DE PROGRESSIÓ**

#### **e. APROXIMACIÓ CLÍNICA EN LA LBM**

##### **i. Estudis a fer al diagnòstic de la LBM**

##### **ii. Estudis a fer al seguiment de la LBM**

##### **iii. Distinció de LBM i LLC a la pràctica clínica**

##### **iv. Altres aspectes clínics**

#### **f. LÍNIES DE FUTUR EN LA LBM**

### **III. INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

**32**

#### **a. LBM i infecció pel VHC**

### **IV. HIPÒTESIS I OBJECTIUS**

**36**

#### **b. Hipòtesis**

#### **c. Objectius**

### **V. PACIENTS I MÈTODES**

**38**

### **VI. RESULTATS**

**48**

### **VII. DISCUSSIÓ**

**65**

### **VIII. CONCLUSIONS**

**70**

### **IX. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES**

**71**

## Abreviacions per ordre alfabètic

AMO: aspirat de moll d'os

AHAI: anèmia hemolítica autoimmunitària

ar-LBM: limfocitosi B monoclonal amb alt risc de progressió

BMO: biòpsia de moll d'os

br-LBM: limfocitosi B monoclonal amb baix risc de progressió

cols.: col·laboradors

DE: desviació estàndard

DILH: diagnòstic integral de laboratori d'hematologia

FISH: *fluorescent in situ hybridization* (hibridació fluorescent in situ)

GMSI: gammapatia monoclonal de significat incert

HEPES: tampó *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HUGTiP: Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

IgH: cadena pesada de les immunoglobulines

ISCN: Sistema Internacional per a la Nomenclatura Citogenètica Humana  
(International System Cytogenetic Nomenclature)

LBM: limfocitosi B monoclonal

LBM-AR: limfocitosi B monoclonal d'alt recompte

LBM-BR: limfocitosi B monoclonal de baix recompte

LBM-LLC: limfocitosi B monoclonal amb fenotip de LLC

LBM-LLCa: limfocitosi B monoclonal amb fenotip de LLC atípica

LBM-no LLC: limfocitosi B monoclonal CD5-

LCM: limfoma de cèl·lules del mantell

LLC: leucèmia limfàtica crònica

LNH: limfoma no Hodgkin

LZM: limfoma de la zona marginal

MO: moll d'os

MAI: malalties autoimmunitàries

OMS: Organització Mundial de la Salut

PBS: tampó fosfat salí

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PTI: púrpura trombocitopènica immune

SG: supervivència gobl

SIL: sistema informàtic del laboratori

SLP: síndrome limfoproliferativa

SLP-B: síndrome limfoproliferativa B

SLT: supervivència lliure de tractament

SvLP: supervivència lliure de progressió

TC: tomografia computeritzada

TPA: *phorbol 12-myristate 13-acetate*

VHC: virus de la hepatitis C

## I. INTRODUCCIÓ

La limfocitosi B monoclonal és la presència de una població de limfòcits B clonals a la sang perifèrica amb un total de limfòcits B inferior a  $5 \times 10^9/L$ , en absència d'altres signes o símptomes de síndrome limfoproliferativa B (SLP-B).

Entre els anys 1991 i 1994 es van realitzar una sèrie d'estudis poblacionals amb la intenció de veure el risc nociu de viure en zones properes a abocadors de desfets (1,2).

En aplicar citometria de flux de 2 colors a la sang de 1499 individus de més de 45 anys, i descartant els que complien criteris de SLP-B, es va detectar una prevalença d'un 0,6% de limfòcits anòmals amb expressió de CD19 (de l'anglès *cluster of differentiation* nº 19, marcador específic de cèl·lules B) i al mateix temps de CD5 (marcador inespecífic de cèl·lules T), el que correspon en part a l'immunofenotip característic de la leucèmia limfàtica crònica (LLC). Aquestes troballes van motivar la creació d'un subcomitè del *International Familial CLL Consortium* per estudiar el que anomenarien limfocitosi B monoclonal. Posteriorment nombrosos estudis han volgut establir la importància d'aquesta entitat en individus sans. El principal debat ha estat entre si es tracta d'una entitat pre-maligna per a leucèmia limfàtica crònica o altres SLP-B (similar a la gammapatia monoclonal de significat incert en el cas del mieloma múltiple) o si es tracta de la inevitable aparició d'expansions monoclonals de cèl·lules B conseqüència de les modificacions que pateix el sistema immune amb l'edat. La descripció d'un patró bimodal segons el recompte de limfòcits B dels diferents individus podria ser una explicació que englobi les dues teories.

D'altra banda, s'ha associat la infecció crònica pel virus de la hepatitis C (VHC) amb una prevalença de LBM notablement superior a la de la població general (28,5% dels infectats per VHC), especialment en els estadis més avançats d'afectació hepàtica. Aquests casos poden acabar desenvolupant una SLP com limfoma no Hodgkin o crioglobulinèmia mixta(3,4). No obstant, manquen estudis que relacionin la càrrega o el genotip viral amb el risc de desenvolupar una LBM.



La present Tesi Doctoral aprofundeix en la descripció dels casos de LBM diagnosticats en un centre, i contribueix en l'estudi de LBM associada a infecció per VHC.

## II. LIMFOCITOSI B MONOCLONAL

### a. DEFINICIÓ I SUBTIPUS

La limfocitosi B monoclonal (LBM) és una entitat proposada al 2005 per un subcomitè del *International Familial CLL Consortium*, de la qual Marti et al. en van definir posteriorment els criteris. Aquests s'establiren com a la detecció immunofenotípica d'una població B monoclonal persistent durant 3 o més mesos, amb presència de restricció de cadenes lleugeres (proporció kappa:lambda = ó >3:1 o <1:3), pèrdua o disminució de l'expressió d'immunoglobulina de superfície en un 25% de les cèl·lules B, o la presència de marcadors específics d'una hemopatia, en absència de criteris definitoris d'aquesta, així com absència de -citopènies relacionades amb- malaltia immunitària o infecciosa(5). La intenció d'aquesta proposta va ser delimitar aquesta entitat com a base de futurs estudis.

### Subtipus

Dins de la LBM, generalment s'ha acceptat incloure tres categories segons els marcadors de les cèl·lules B: a) la més prevalent, tipus leucèmia limfàtica crònica (LLC), amb expressió de CD19+, CD5+, CD20<sup>f1</sup>, sIg<sup>f</sup>, CD23, proporció kappa:lambda = ó >3:1 o <1:3 (d'ara endavant, LBM-LLC) b) la de subtipus similar a LLC atípica (LBM-LLCa), CD5<sup>b2</sup>, CD20+, proporció kappa:lambda = ó >3:1 o <1:3 o altres poblacions limfocitàries CD5+ sense complir criteris de LLC<sup>3</sup>, i c) LBM de tipus no LLC (LBM-CD5-): població B CD5 negativa, diferenciada i separada o amb proporció kappa:lambda = ó >3:1 o <1:3. Taula 1. A la taula 2 es detallen les diferències entre LBM, LLC i LLBD.

---

<sup>1</sup> s'indicarà amb una "f" petita quan l'expressió del marcador cel·lular precedent és feble.

<sup>2</sup> s'indicarà amb una "b" petita quan l'expressió del marcador cel·lular precedent és brillant o intensa.

<sup>3</sup> Hi ha grups que han considerat altres poblacions limfocitàries CD5+ amb fenotip característic d'altres SLP-B (com limfoma marginal o limfoma del mantell) dins del grup de LBM de tipus no LLC. D'altra banda, existeixen estudis on s'ha considerat com a LBM una població CD19 o CD20 amb CD5 sense més investigacions fenotípiques.

## Taula 1.

### Críteris diagnòstics i subclassificació de LBM (adaptat de Marti i cols. [col·laboradors], Shanafelt i cols. (5,6))

CRITERIS DIAGNÒSTICS
1. Documentació de població B clonal <sup>1</sup> per un o més dels següents criteris: <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Restricció de cadenes lleugeres               <ul style="list-style-type: none"> <li>· proporció global k:λ &gt;3:1 ó &lt;0,3 ó</li> <li>· més d'un 25% de limfòcits B amb expressió disminuïda d'immunoglobulina</li> </ul> </li> <li>b. Reordenament monoclonal de cadena pesada IGHV</li> </ul>
2. Presència d'immunofenotip específic d'hemopatia <sup>2</sup>
3. Recompte de limfòcits B <5x 10 <sup>9</sup> /L
4. Absència d'altres característiques de síndrome limfoproliferativa o malaltia autoimmunitària <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Exploració física normal</li> <li>b. Absència de símptomes B atribuïbles a LNH</li> <li>c. absència de síndrome limfoproliferativa o malaltia autoimmunitària</li> </ul>
SUBCLASSIFICACIÓ
A. LBM amb fenotip de LLC <ul style="list-style-type: none"> <li>- Co-expressió de CD5/CD19, CD20<sup>f</sup>, CD23</li> <li>- Restricció de cadenes lleugeres amb expressió feble de slg<sup>3</sup></li> </ul>
B. LBM amb fenotip de LLC atípica <ul style="list-style-type: none"> <li>- Co-expressió de CD5/CD19, però CD23 negatiu o CD20<sup>b</sup></li> <li>- Restricció de cadena lleugera amb expressió de slg moderada-intensa</li> <li>- Exclusió de t(11;14) per descartar limfoma del mantell<sup>4</sup></li> </ul>
C. LBM amb fenotip no de LLC <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD5 negatiu</li> <li>- Expressió de CD20</li> <li>- Restricció de cadenes lleugeres amb expressió de slg moderada-intensa</li> </ul>

1. Quan sigui possible, s'ha de repetir l'estudi per verificar la persistència de la població B monoclonal en un període de 3 mesos. 2. En absència de fenotip específic d'hemopatia, una proporció k: λ molt esbiaixada pot ser resultat d'un procés reactiu. 3. Clones molt petites de LBM poden ser oligoclonals i presentar proporcions normals k: λ 4. Si a l'estudi es detecten alteracions citogenètiques o immunofenotípiques característiques de limfoma marginal, també es pot considerar l'exclusió d'aquest subgrup.

IGHV: cadena pesada de les immunoglobulines. LNH: limfoma no Hodgkin. LBM: limfocitosi B monoclonal. LLC: leucèmia limfàtica crònica. f: expressió feble. b: expressió brillant/intensa. slg: immunoglobulina de superfície.

## Taula 2

### Distinció entre limfocitosi B monoclonal, limfoma limfocític ben diferenciat i leucèmia limfàtica crònica (adaptat de Shanafelt i cols. (6))

	Cèls. B clonals amb fenotip de LLC	Recompte perifèric de cèls. B < 5 x 10 <sup>9</sup> /L	Limfadenopaties o hepato-esplenomegàlia	Troballes al moll d'os
--	------------------------------------	--	---	------------------------

LBM	si	si	no	Estudi requerit diagnòstic*	no
LLBD	si	si	si		pel
LLC	si	no	si o no		

\*Les escasses dades disponibles suggereixen que a gairebé tots els pacients amb LBM identificada clínicament s'observa infiltració medul·lar si se'ls practica una biòpsia de moll d'os, amb un promig de 10-20% d'afectació(7). S'han detectat individus amb LBM i una infiltració més extensa (70-80%), el que no està relacionat amb risc de progressió(6).

## **b. EPIDEMIOLOGIA DE LA LBM**

En la darrera dècada, s'han realitzat múltiples estudis per tal de determinar la prevalença de la LBM. Segons el tipus d'estudis realitzats i la sensibilitat de la tècnica utilitzada, la prevalença, i la proporció home:dona varien enormement. Així, s'ha descrit prevalences des de 0,12% a un 14,3% de la població adulta sana(8–12), i fins virtualment un 100% de la població de més de 70 anys, si s'analitza grans volums de sang(8). La proporció home:dona varia entre un 1,2 i 1,8(9).

A partir de la identificació d'una població B clonal a 9/1499 (0,6%) individus sans de més de 45 anys per part del U.S. Center of Disease Control(1,2), molts estudis s'han dirigit a definir la prevalença dins de la població sana (taula 3). Cal destacar que ens alguns estudis s'ha considerat com a LBM una població CD19 o CD20 amb CD5 sense més investigacions fenotípiques. En menys proporció, altres estudis s'han centrat en LBM detectades arran de l'estudi de pacients amb hemograma normal o amb limfocitosis absolutes (taula 4).

La prevalença de LBM més elevada en pacients sans s'ha reportat en els estudis de familiars de pacients afectes de LLC amb predisposició genètica, concretament en familiars de primer grau. Els estudis més recents, i per tant que han utilitzat tècniques més sensibles, han reportat un risc relatiu 17 vegades més elevat a familiars joves (16-40 anys) de pacients amb LLC que a la població general(6,13–15), el que representa percentatges globals de 13,5-18% en familiars de LLC(14). Les diferències respecte als altres grups poblacionals es redueixen o s'eliminen quan es comparen individus d'edat més avançada, segons els diferents treballs(16–18). En el seu estudi, Almeida i col·laboradors (cols.) suggereixen que les diferències de prevalença reportades poden ser degudes a factors genètics o del microambient, a més de la sensibilitat de la tècnica aplicada. Analitzant grans volums de sang (fins a 1,2 mil·lilitres) de 639 adults sans de més de 40 anys, i aplicant un model matemàtic d'extrapolació de dades, demostren que amb més volum de mostra, el 100% d'individus majors de 70 anys presenten una població d'un mínim de 50 esdeveniments compatible amb LBM. En vista d'aquests

resultats, suggereixen que es pot tractar de la contrapart normal de la LLC més que d'un precursor d'aquesta(8).

Per tal de detectar una cèl·lula corresponent a una població B monoclonal per cada  $\mu\text{L}$ , es recomana analitzar un mínim de 200 000 esdeveniments amb un protocol de 5 colors (CD19, CD5, CD20, kappa, lambda). L'estudi del reordenament de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgH) per biologia molecular i l'estudi d'hibridació in situ amb emissió de fluorescència (FISH) en cèl·lules classificades i aïllades (*cell sorting*) en poden confirmar la clonalitat i les anomalies citogenètiques(6).

**Taula 3. Estudis que han recollit la freqüència de LBM entre individus sans i donants de sang (adaptat de Shim i cols. (9))**

Estudi		Paràmetres de citometria de flux			Freqüència de LBM N (%)	
Autors, any	Població	Nº colors	Marcadors avaluats	Nº esdeveniments	LBM-LLC	LBM-LLCa / LBM-no LLC
Shim YK i cols. 2007 (2)	N=1926 Edats: 40-76 Població general	2	CD19 ó CD20, CD45, CD3, CD5	NE	11 (0,6)	NE
Rachel JM i cols. 2007 (19)	N=5141 Edats: 17-70+ Donants de sang	2	CD19, CD5; en mostres seleccionades: CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD14, CD20, CD23, $\kappa$ , $\lambda$	NE	6 (0,14) global 5/540 (0,93) $\geq$ 65 anys 4/272 (1,47) $\geq$ 70 anys	NE
Dagklis A i cols. 2009 (20)	N=1725 Edat: 18-102 Població general	5	CD5, CD19, CD20, $\kappa$ , $\lambda$	$<5 \times 10^5$	128 (5,2) (6,7) $\geq$ 40 anys	(1,1) LBM-LLCa/ (1,2) LBM-no LLC
Nieto WG i cols. 2009 (21)	N=608 Edat: >40 Voluntaris sans procedents de primària	8	CD20, CD45, CD8, CD56, CD19, CD3, CD38, Bcl2, CD23, CD10, CD5, $\kappa$ , $\lambda$	$5 \times 10^6$	73 (12)	NE/ 14 (2,3) LBM-no LLC
Keutgens A i cols. 2016 (12)	N=597 Edats: 64-94	11	CD45, CD19, CD20, CD38, CD27, CD23, CD10, CD5, CD3, $\kappa$ , $\lambda$	NE	123 (20,6)	NE/ 8 (1,3)

NE: no especificat. LBM: limfocitosi B monoclonal. LBM-LLC: limfocitosi B monoclonal de tipus LLC. LBM-LLCa: limfocitosi B monoclonal de tipus LLC atípica. LBM-no LLC: limfocitosi B monoclonal de tipus no LLC

**Taula 4. Estudis que han recollit la freqüència de LBM en pacients (excloent familiars de LLC) (Adaptat de Shim i cols, Mowery i cols. (9,16))**

<b>Autors, any</b>	<b>Rang edat</b>	<b>N</b>	<b>Freqüència de LBM (N)</b>	<b>Freqüència de LBM (%)</b>
Shim et al, 2007	40-76	1926		
Rawstron et al, 2008. Cohort 1(22)	62-80	1520	105	6,9
Rawstron et al, 2008. Cohort 2(*) (22)	39-99	2228	309	13,9
Ghia et al, 2004(23)	>65	500	32	5,4
Rawstron et al, 2002(13)	>40	910	41	4,5

\* remesos per limfocitosi actual o prèvia

### c. CARACTERÍSTIQUES BIOLÒGIQUES DE LA LBM

Múltiples estudis s'han centrat en cercar les diferències entre LBM i els diferents SLP fenotípicament equivalents, en concret la LLC per ser aquesta darrera la síndrome limfoproliferativa més representada fenotípicament i evolutivament entre les LBM (68-78% de les LBM (9)). No s'ha demostrat de forma fefaent diferències respecte als marcadors antigènics o immunofenotípics<sup>4</sup> ni respecte al perfil d'expressió gènica (al contrari, Rawstron i col·laboradors van demostrar que la LBM-LLC i la LLC s'agrupaven a una anàlisi de *k-means* no supervisat(24)), trobant-se una distribució similar especialment pel que fa a trisomia del cromosoma 12 i deleció del cromosoma 13(q14). Les delecions dels cromosomes 11q o 17p característiques de la LLC són menys freqüents a la LBM (6,13,23,25), però tenen una prevalença equiparable amb la LLC de bon pronòstic(22,26). La taula 5 resumeix les alteracions genètiques de la LBM descrites en un recull de treballs.

Les úniques característiques diferencials que s'han detectat entre la LBM i la LLC apareixen quan la LBM es diferencia entre baix i elevat recompte, pel que darrerament s'ha establert un llindar de  $< i \geq 0,5 \times 10^9$  limfòcits B/L, respectivament (veure següent apartat).

**Taula 5. Anomalies cromosòmiques en LBM-LLC (adaptat de Rawstron i cols.(24))**

	del(13q), %(N)	trisomia 12 %(N)	del(11q) % (N)	del(17p) % (N)
Leeds, pacients amb LBM sense limfocitosi (22)	39 (15/38)	18 (4/22)	0 (0/21)	0 (0/10)
Salamanca, pacients de primària(21)	27 (10/37)	5 (2/37)	0 (0/37)	0 (0/37)
Duke, familiars de pacients amb LLC, no limfocitosi(27)	67 (5/9)	-	-	-

<sup>4</sup> Dos treballs van trobar associació entre una elevada proporció de CD38 i la progressió de LBM a LLC amb requeriment de tractament(7,88), però un tercer treball no ho va verificar(22).



Leeds, pacients amb LBM i limfocitosi(22)	58 (19/33)	21 (7/33)	6 (2/33)	3 (1/33)
Mayo, pacients amb LBM i limfocitosi(28)	44 (56/126)	18 (23/126)	2 (2/126)	3 (4/126)

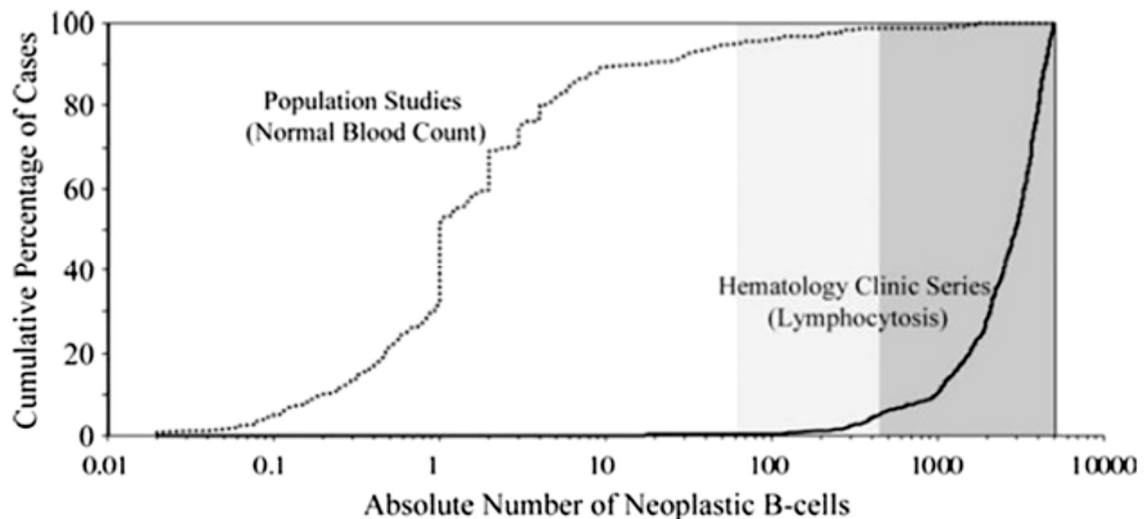
LBM-LLC: limfocitosi B monoclonal amb fenotip de LLC

### i. LBM de baix i elevat recompte

L'any 2010, en el context de l'edició d'un suplement especial dedicat a la LBM a la revista *Cytometry part B (Clinical Cytometry)*, Rawstron i cols. van realitzar una anàlisi dels percentatges acumulatius de casos d'acord amb el nombre de cèl·lules B clonals dels diferents estudis publicats, amb dades d'origen poblacional i de pacients remesos a un centre sanitari per a estudi hematològic, habitualment a rel de la detecció d'una limfocitosi. L'anàlisi va revelar una distribució bimodal dels recomptes de cèl·lules B, amb una mínima superposició de casos. Entre els casos identificats a partir dels estudis poblacionals, la majoria presentava recomptes d'entre 0,1 i 10 limfòcits B clonals/ $\mu$ L (mediana de 1/ $\mu$ L). En canvi, entre els casos identificats a les cohorts clíniques, aquest recompte ascendia a 500-5000 limfòcits B clonals/ $\mu$ L (mediana de 2939/ $\mu$ L)(figura 1)(10,29). Molt pocs casos es trobaven entre els 2 grups de pacients, el que va portar a la definició de la LBM de baix recompte (LBM-BR) i alt recompte (LBM-AR) amb un llindar de  $< i \geq 0,5 \times 10^9$  limfòcits B/L, respectivament.

### Figura 1

**Distribució del recompte de limfòcits B clonals de tipus LLC en els diferents estudis publicats.**



Percentatge acumulatiu de casos segons el nombre absolut de limfòcits B clonals provinents d'estudis amb individus de la població general amb hemograma normal (línia de punts) i de sèries de pacients remesos per a estudi hematològic, habitualment per limfocitosi actual o prèvia (línia contínua). En el recull d'estudis poblacionals, els pacients presenten una mediana de 1/ $\mu$ L de limfòcits B clonals amb el 95% de casos amb menys de 56 limfòcits B clonals/ $\mu$ L (fons blanc), comparat amb les sèries clíniques, que presenten una mediana de 2939/ $\mu$ L de limfòcits B clonals amb el 95% de casos amb més de 447 limfòcits B clonals/ $\mu$ L (fons gris fosc). Un baix nombre de casos es troben en el mateix rang de limfòcits B que els individus sense limfòcits B anòmals detectables (fons gris clar).

Imatge original presa de Rawstron i cols. (29)

A partir de l'estratificació diferencial de la LBM-BR i LBM-AR pel que fa als recomptes limfocitaris, diferents estudis han investigat els possibles trets distintius entre les dues entitats, i entre aquestes i la LLC. En conseqüència, s'ha descobert que la LBM-BR presenta sovint heterogeneïtat intraclonal (definida com la presència de múltiples clones amb cadenes lleugeres kappa o lambda diferents), a diferència de la LBM-AR(10,29,30). En segon lloc, s'ha trobat diferències pel que fa al repertori d'immunoglobulines utilitzat: reordenaments específics dels gens de les immunoglobulines com IGHV 4-34, 3-32, i 1-69 es troben escassament representats a la LBM-BR en favor de IGHV4-59, IGHV4-61 o IGHV3-64, a diferència del que passa a la LBM-AR i a la LLC (ambdues entitats tenen més representació dels primers gens citats). Taula 5. Aquesta diferència es manté independentment de l'estat mutacional de la LLC o la LBM-AR amb què es compara.

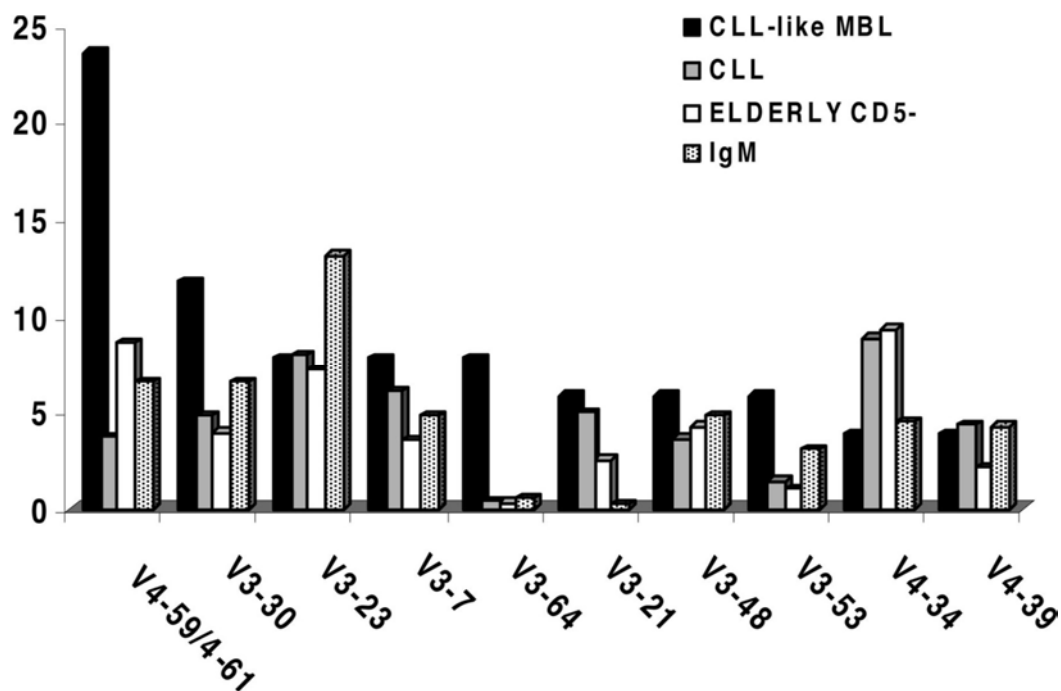
**Taula 5. Repertori i mutació de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines (IGHV) en la limfocitosi B monoclonal tipus LLC (LBM-LLC) (adaptat de Rawstron i cols. (24))**

Font	Cèls. B amb fenotip de LLC, % promig	Casos amb >2% mutació IGHV	Gen IGHV predominant a les cèls. amb fenotip de LLC	Repertori IGHV similar a la LLC?
Rawstron i cols. 2008(22)	100	18/20 (90%)	3-07, 3-23, 4-34	Si
Shanafelt i cols. 2009(28)	100	84/109 (77%)	3-07, 1-69, 4-34, 3-23	Si
Rawstron i cols. 2008(22)	80	18/20 (90%)	3-07, 3-23, 4-34	Si
Lanasa i cols. 2008(27)	25	12/16 (75%)	3-07, 4-34	Si
Dagklis i cols. 2009(26)	7	36/51 (70%)	4-59/61	No
Nieto i cols. 2009 (21)	0,4	2/7 (29%)	No associat a LLC	No

El repertori d'immunoglobulines utilitzat a la LBM-BR, subtipus LLC, tampoc coincideix amb el de la població sana d'edat avançada (figura 2) (10,26,31).

## **Figura 2**

**Repertori de gens de les immunoglobulines a diferents poblacions, estratificats segons l'ús de les immunoglobulines a la LBM-LLC.**



Freqüència relativa de cada gen IGHV, estratificats segons l'ús de les immunoglobulines a la limfocitosi B monoclonal de tipus LLC (LBM-LLC). El diagrama mostra a cada franja, per ordre, els casos de LBM-LLC, pacients amb LLC, limfòcits CD19+/CD5- a població d'avançada edat i limfòcits B IgM+

Imatge original presa de Dagklis i cols.(26)

A més, la comparació entre LBM-BR, LBM amb limfocitosi i LLC ha descartat que les característiques de la LBM-BR siguin equiparables a les de la LLC "mutada" (és a dir, amb diferències a la seqüència del gen *IGHV* superiors al 98%). El percentatge de casos "mutats" entre la LBM-BR, LBM amb limfocitosi i LLC varia significativament (70%, 90% i 50% respectivament)(10,20,31). Un altre punt que cal destacar és la diferència entre el percentatge de casos que presenten estereotípia (homologia de la seqüència) en la regió complementària HCDR3, que correspon a un 20% a la LLC(32,33) mentre que representa menys d'un 5% als 51 casos de LBM-BR estudiats per Dagklis i cols.(20). La cinquena diferència establerta entre LBM-BR i LBM-AR o LLC són les mutacions recentment descrites a la LLC pertanyents als gens *SF3B1* o *NOTCH1*, descrites al 15 i 10% dels pacients d'aquest grup, mentre que apareixen molt rarament a la LBM (3,2% i 1,5% de *NOTCH1* i *SF3B1* a LBM-AR, respectivament)(10,34,35).

En el seu conjunt, aquestes troballes suggereixen una evolució esglaonada al llarg del temps de la LBM-AR a la LLC mitjançant l'adquisició d'anomalies moleculars d'alt risc (infreqüent a la pràctica clínica, entre un 1% i un 2% amb requeriment de tractament)(28,29), i una ínfima probabilitat de que la LBM-BR progressi a LBM-AR o LLC.

## **ii. LBM d'elevat recompte i LLC estadi Rai 0**

A la pràctica clínica, la distinció entre LBM (especialment LBM-AR) i LLC encara resulta un tema controvertit. Històricament es considerava el recompte total de leucòcits per a definir la LLC (criteris diagnòstics de LLC, anys 1988 i 1996)(36). Després de la publicació al 2005 dels criteris diagnòstics de LBM(37), es va passar a considerar el dintell de  $5 \times 10^9/L$  limfòcits B, resultant en una superposició diagnòstica entre els casos previs de LLC Rai 0, en endavant re-classificats com a LBbM (fins al 40% en els diferents estudis publicats)(6,38). La importància de re-classificar aquests casos a la pràctica habitual no està ben establerta, més enllà de l'impacte de diagnosticar un pacient de leucèmia o d'un estat pre-leucèmic, amb la repercussió en la percepció de salut i/o sobre les asseguradores privades que aquest diagnòstic pugui tenir.

Malgrat això, s'ha de considerar que una majoria de nous casos de LBM probablement pertanyen al grup de LBM-AR ja que s'han detectat en un context clínic, normalment en context de limfocitosi, i requeriran seguiment.

Diversos autors proposen fer la distinció entre els SLPB de tipus LLC quan aquesta diferència tingui realment un impacte pronòstic(6). Ja amb la definició feta al 2005, es veia que l'etiquetatge d'una LBM en base al recompte de limfòcits B tenia impacte en la supervivència lliure de tractament (SLT), el que no succeïa quan es prenia com a referència el recompte absolut de leucòcits. Com s'ha comentat, el risc de progressió a LLC que requereixi tractament entre individus amb LBM és d'un 1-2% a l'any enfront d'un 5-7% anual en pacients amb LLC Rai 0, diferència que s'accentua considerablement si es pren com a referència el risc de rebre tractament als 10 anys (7-

14% enfront a 50-70%). Des d'un altre punt de vista, prenent la major importància pronòstica de la supervivència global (SG), s'ha vist que el recompte de limfòcits B es comporta com a una variable contínua i que la xifra determinant d'una pitjor SG de forma independent es troba al voltant dels  $10\text{-}11 \times 10^9/\text{L}$  limfòcits B, el que també implica una pitjor SLT(29,38). S'ha de destacar que aquest valor de limfòcits B també és el millor predictor de la disfunció de limfòcits T associada amb LLC, el que també pot explicar part de la evolució clínica(39).

### **iii. LBM ganglionar**

La troballa d'infiltració per LLC a adenopaties biopsiades per a l'estudi diagnòstic de diferents entitats ha plantejat el concepte de LBM ganglionar, ja que aquestes sovint són de mida inferior o al límit de la normalitat. La definició de LBM inclou l'absència d'adenopaties(37); la presència d'aquestes seria diagnòstica de limfoma limfocític ben diferenciat (LLBD) si la xifra de limfòcits B en sang perifèrica (SP) no supera els  $5 \times 10^9/\text{L}$ . D'altra banda, l'evolució a LLBD és comú entre els pacients amb LBM, el que ha fet plantejar la necessitat de realitzar una prova d'imatge (per exemple, una tomografia computeritzada [TC]) a tots els casos de LBM per descartar adenomegàlies a regions no palpables. En un dels pocs estudis que han mirat l'evolució a LLC/LLBD entre els pacients diagnosticats de LBM amb o sense adenopaties a la TC del diagnòstic, Gentile i cols. no van demostrar diferències amb una mitjana de seguiment de 35 mesos(40), el que ha portat a no recomanar la realització de proves d'imatge de forma sistemàtica a les LBM de nou diagnòstic. Strati i cols. recomanen diagnosticar de LLBD només en els casos en què es trobin adenopaties superiors al límit de la normalitat ( $>1,5$  cm) en pacients on una biòpsia ganglionar ha demostrat infiltració per SLP-B amb fenotip de LLC(10).

### **iv. LBM no LLC**

Entre un 1 i un 2,5% d'adults sans amb hemograma normal o amb limfocitosi absoluta presenten clones de limfòcits B amb fenotip no característic de LLC(13,26,41). En el

seu estudi, Nieto i cols. van ampliar les escasses dades reportades fins llavors en casos de LBM amb fenotip diferent de LLC en la població general, descrivint les característiques basals i l'evolució clínica de 13 casos en una sèrie de 639 individus sans majors de 40 anys (2%). La freqüència absoluta de les LBM amb fenotip diferent de LLC descrites per Nieto i cols. va ser superior a la reportada anteriorment, considerant que van realitzar un estudi immunofenotípic més sensible i extens (i per tant una millor caracterització dels diferents subtipus de LBM d'acord amb la classificació de la Organització Mundial de la Salut (OMS) de 2008(42), i que altres grups havien considerat anteriorment només les LBM CD5- com a "no LLC" de forma genèrica, sense tenir en compte que algunes LBM CD5+ es podrien etiquetar com a diferents de LBM-LLCa. Convé destacar de Nieto i cols. van mantenir el diagnòstic de LBM fins i tot amb troballes citogenètiques definitòries de SLP-B com la t(11;14), i ho van etiquetar com a LBM amb immunofenotip de limfoma de cèl·lules del mantell (LCM) (1 cas). Igual que altres grups, defensen que les LBM amb fenotip diferent de LLC presenten característiques immunofenotípiques de diferents SLP-B (OMS) però és poc freqüent trobar-hi associades les alteracions citogenètiques úniques habituals (com la t(14;18) o la t(11;14)). Rawstron i cols. van suggerir que per detectar aquestes poblacions CD5- és necessari que la població B estigui disminuïda, i que aquests casos tenen més afectació ganglionar i de moll d'os(24). En la mateixa línia, Keutgens i cols. proposen realitzar una TC i un aspirat de moll d'os (AMO) al diagnòstic de les LBM amb fenotip diferent de LLC, i incloure l'estudi de la t(11;14) a les LBM amb fenotip diferent de LLC i CD5+(11). Respecte a l'edat d'aparició, els estudis discrepen en la prevalença en els diferents grups d'edat: Ghia i cols. suggerien que la freqüència de LBM-no LLC no augmentava amb l'edat(23), mentre que Nieto i cols. observaven a la seva sèrie un increment progressiu amb l'envelliment (des de 0,4% a individus entre 40 i 59 anys, fins a 5,4% a individus majors de 80 anys)(41). Al seu torn, Amato i cols. defensaven que les LBM-no LLC en casos amb limfocitosi debuten a una edat més precoç(43). A més, Nieto i cols. descrivien una clara predominança del sexe masculí(41).

La taula 6 mostra dades clíniques i analítiques dels pacients analitzats en els diferents estudis.



**Taula 6. Dades clíniques dels estudis que han recollit LBM-no LLC i LBM-LLCa\***

Autors, any	Grup d'estudi	Edat mediana global (extrems), anys	N global	Freqüència de LBM-no LLC N (%)	Sexe, edat pacients LBM-no LLC	Limfòcits x10 <sup>9</sup> /L Mediana (extrems)
(15).	LBM-LLCa i LBM-no LLC en familiars de LLC de 1r grau	45 (23-79)	59	1 (1,7)	M, 81	En rang
(13).	LBM-no LLC CD5-pacients de CCEE	>40	910	9 (1)	NR, 78 (49-88)	NR
(23).	LBM-LLCa pacients de primària	74 (65-98)	500	3 (0,6)	1M, 2F, 68 (65-78)	En rang
(23).	LBM-no LLC CD5-pacients de primària	74 (65-98)	500	7 (1,4)	5M, 2F, 78 (76-86)	En rang
(43).	LBM-no LLC CD5-Pacients avaluats per limfocitosi	NA	NA	NA	4M, 3F, 75 (56-80)	4,8 (3,6-9,4)
(26).	LBM-LLCa estudi poblacional	55 (18-102)	1725	20 (1,2)	NR, NR (70-79)	En rang
(26).	LBM-no LLC estudi poblacional	55 (18-102)	1725	19 (1,1)	NR	En rang
(44).	LBM-no LLC CD5-pacients amb LLC posterior	NA	45	1 (2,2)	NR	NR
(41).	LBM-no LLC (CD5+ i CD5-) en població general	62 (49-75)	639	13 (2)	9M, 4F, 73 (63-83)	En rang**
(12).	LBM no LLC (CD5+ i CD5-) en dones post-menopausiques	NR, (64-94)	597	30 (5)	30F, NR (64-94)	NR

\* adaptat de (41)

NR: no recollit. NA: no aplica. \*\*3 casos presentaven limfocitosi lleu, 3,75, 3,66 i 3,83 x10<sup>9</sup> limfòcits/L

#### **d. HISTÒRIA NATURAL DE LA LBM. RISC DE PROGRESSIÓ**

Entre les LBM de baix recompte, normalment amb xifra total de limfòcits entre els intervals de referència, cal destacar un percentatge valorable de casos oligoclonals o multiclonals (20% en el treball de Nieto i cols.(41)), com ja s'ha apuntat anteriorment. Aquest fet es repeteix en els diferents treballs i ateny a tots els subtipus fenotípics de LBM, el que explica la diversificació oligoclonal associada a les expansions mitjançades per estímuls antigènics i dóna suport al concepte que les LBM en individus amb recomptes limfocitaris normals són de naturalesa reactiva.

Contràriament, la hipòtesi més acceptada per a les LBM d'elevat recompte, és que no és una condició fisiològica que acaba per afectar tots els individus a mesura que envelleixen, sinó que es tracta d'una afectació en pacients seleccionats, exposats almenys a alguns dels factors predisponents descrits a la taula 6.

**Taula 6. Factors de risc pel desenvolupament de LBM i la seva progressió a LLC amb requeriment de tractament\***

<b>Factors de risc de LBM</b>	<b>Factors de risc de progressió a LLC</b>
Història familiar de LLC	Positivitat CD38
Polimorfismes genètics**	IGHV no mutada
Edat	Deleció 17p
Infeccions	Recompte de limfòcits B elevat

\*adaptat de Strati P and Shanafelt TD, 2015 (10) \*\* rs17483466 (odds ratio [OR] =1.27; P = .02), rs13397985 (OR =1.40; P = 1.72 = 10=3), rs757978 (OR =1.38; P = .02), rs872071 (OR = 1.27; P = 7.75 = 10=3), rs2456449 (OR = 1.31; P = 3.14 = 10=3), i rs735665 (OR =1.63; P = 6.86 = 10=6)(45).

La LLC, dins de les SLP-B, és de les malalties on més s'ha demostrat una predisposició genètica (un 10% de les LLC són familiars, és a dir, amb més d'un membre afecte de LLC). A més, els estudis realitzats en familiars sans de LLC amb predisposició genètica mostren una elevada incidència de LBM (14-18%)(15,46,47), generalment entre 2 i 4

vegades la descrita en la població general. Aquesta incidència també es troba augmentada entre familiars de LLC esporàdica, en un percentatge menor (4,1% de 167 familiars, 15,6% en >60 anys)(48). A més, s'ha demostrat associació de sis dels 20 polimorfismes genètics relacionats amb LLC familiar, amb el risc de desenvolupar LBM(45). Com ja s'ha destacat en capítols anteriors, la freqüència de LBM a la població general augmenta amb l'edat, de manera que els estudis més recents revelen un 26% d'afectació en dones >64 anys sense limfocitosi(12) i fins un 75% en individus de més de 90 anys(21). Respecte a la seva relació amb les infeccions, hi ha diversos estudis que recolzen l'associació positiva de LBM amb neumònia(49,50) o infecció pel VHC(3). Globalment, es considera que la LBM-AR presenta un risc de desenvolupar infeccions incrementat 3 vegades respecte a la població general(11). De la infecció per VHC i de la seva relació amb la LBM en parlarem més extensament en capítols posteriors.

Com és evident, la principal preocupació entre individus afectes de LBM, els seus metges i les asseguradores, és el risc de desenvolupar una SLP-B que impliqui tractament o tingui repercussió vital. Fins al moment actual pocs treballs han estudiat l'evolució de la LBM(6,24), alguns dels quals ja s'han mencionat. Aquests es resumeixen a continuació.

En primer lloc, Fung i cols. van avaluar l'evolució de 114 LLC estadi Rai 0 i de 54 LBM-LLC, aquestes darreres durant una mediana de 30 mesos (0-119,6). Els pacients amb LBM van presentar una baixa probabilitat de progressió precoç, i cap va precisar tractament ni va morir per causes relacionades amb la LLC. Els autors van trobar una tendència a una millor SLP en el grup de LBM, però no van trobar cap diferència en la supervivència global(51).

Rawstron i cols. van monitoritzar 185 pacients durant una mediana de 6,7 anys (extremes 0,2-11,8 anys), en un estudi prospectiu de pacients provinents del medi hospitalari. Van trobar limfocitosi progressiva en un 28% (51 pacients), amb el recompte total de limfòcits B com a únic factor de risc independent associat, i només un 7% (13 pacients) van requerir tractament específic per a LLC. Van concloure que en pacients amb LBM i

limfocitosi, el risc de desenvolupar LLC que requereixi tractament és d'un 1,1% a l'any(22).

De manera similar, Mulligan i cols. van recollir dades de forma retrospectiva de 220 pacients amb seguiment acceptable (4,1 anys, extrems 1,0-8,5) a partir d'una base de dades de laboratori. Trenta-cinc per cent (76 pacients) van progressar a LLC, amb un 8% (18 pacients) adquirint  $>30 \times 10^9$  limfòcits/L(52).

El quart estudi que proporciona dades d'evolució és un treball retrospectiu amb dades d'origen hospitalari, on es compara 302 pacients amb LBM-LLC i 313 pacients amb LLC estadi Rai 0. Entre els pacients amb LBM, novament el recompte de limfòcits B com a variable contínua i CD38 (però no l'edat i el sexe) van ser variables predictives de temps fins al tractament. La taxa de progressió a LLC amb requeriment de tractament va ser d'un 1,4% a l'any en els primers 5 anys de seguiment. No es van observar diferències en la supervivència entre els individus amb diferents proporcions de cèl·lules B amb fenotip de LLC en els casos amb  $<1,5 \times 10^9$ /L limfòcits B. Els autors van descriure diferències significatives en SLT però no en SG entre LBM-LLC i LLC Rai 0, i remarquen que el millor llindar de limfòcits B per predir una pitjor SLT i SG és el de  $11 \times 10^9$ /L (53). Per altra banda, Rossi i cols. van estudiar una cohort de pacients del medi hospitalari i van comparar l'evolució entre pacients amb LBM (N=123) i pacients diagnosticats de LLC de tots els estadis (N=337, Rai 0:124; I-II: 129, III-IV:54). En la comparació amb pacients amb LLC estadi Rai 0, els diagnosticats de LBM presentaven un percentatge significativament inferior de limfòcits al moll d'os, una inferior prevalença d'infiltració de tipus difús del moll d'os, i una inferior beta-2-microglobulina. A més, la funció immune, mesurada com nivells d'immunoglobulines (Ig), estava més preservada a la LBM que a la LLC Rai 0 de forma significativa (tant per a IgG com per a IgA i IgM). Això es tradueix en un inferior risc d'infecció: abans de rebre tractament quimioteràpic, la incidència d'infecció va ser de 10,9 per 100 pacients-any per a LBM i de 15 x 100 pacients-any per a LLC (p=0,030). D'altra banda, els autors van trobar una inferior prevalença d'alteracions citogenètiques d'alt risc (del[11q22], del[17p13] i mutacions de *TP53*) entre

els individus amb LBM, comparat amb els individus amb LLC Rai 0. En canvi, no van trobar diferències en l'estereotípia del receptor HCDR3 ni en la distribució dels gens *IGHV*. Els individus amb LBM tenien una superior SLT respecte els pacients amb LBM estadi Rai 0 (68,7 *versus* 51,3 a 10 anys, respectivament). La incidència d'evolució a LLC o LLBD va ser d'un 45% (56 casos), en una mediana de 55 mesos (10% va progressar anualment en els primers 6 anys, mentre que 3% va progressar anualment a partir del 7<sup>o</sup> any). Aquells casos amb recomptes de cèl·lules B més elevats tenien més probabilitat de progressar a LLC/LLBD, d'acord amb que havien descrit altres autors(22). Entre individus amb LBM, l'anàlisi univariant va demostrar com factors que afectaven la SLT, l'estat mutacional del gen *IGHV*, l'expressió de CD38, l'expressió de CD49d, i la presència d'alteracions citogenètiques per FISH. A l'anàlisi multivariant, la presència de trisomia 12 o del(17p13) per FISH van ser els únics predictors independents de SLT(7). Englobant les dades d'aquests estudis, podem concloure que la majoria d'individus amb LBM-LLC no progressaran a LLC en un període de 5 anys. Un 75% aproximadament estarà viu amb un recompte de limfòcits estable i entre un 1 i un 4% anual desenvoluparà LLC que requerirà tractament, amb una taxa de progressió similar a la de gammapatia monoclonal de significat incert(GMSI) cap a mieloma múltiple. El risc de progressió d'una LBM-LLC (LBM-AR) a LLC o LLBD és d'un 10% per any els 6 primers anys, seguit d'un 3% per any els anys posteriors (temps promig de progressió a LLC/ LLBD de 55 mesos)(7,54). Segons Rossi i cols. no s'ha identificat cap *plateau*, el que indicaria que a llarg terme, eventualment totes les LBM-LLC progressarien a LLC. Malgrat això, Marti i cols. suggereixen que les LBM-BR podrien desaparèixer espontàniament o mantenir-se estables en el temps(7,54). El risc de progressió de LLBD indolent a LLBD que requereixi tractament, és d'un 5-7% anual, mentre que el risc de progressió d'una LBM-LLC d'alt recompte a LLC que requereixi tractament és d'un 1-2% anual. Contràriament, aquest risc és negligible en el cas de LBM-BR. Manquen dades bibliogràfiques sobre el risc d'evolució de les LBM-LLCa i les LBM-no LLC en LNH(7,11,22,53).

Respecte el risc de mortalitat, aquest és insignificant en el cas de LBM-BR, mentre que augmenta a un 10-20% als 10 anys en el cas de LLC-AR i a un 20% en el cas de LLC. La probabilitat de supervivència és superior en les LBM-LLC i LBM-noLLC (69% i 57% de supervivència a 5 anys) comparat amb les LBM-LLCa (45% de supervivència a 5 anys), probablement degut al fet que aquesta darrera categoria inclou les clones amb fenotip compatible amb LCM(11).

D'altra banda, s'ha de destacar l'elevada incidència de segona neoplàsia entre individus afectes de LLC respecte a la població general, així com l'aparició de fenòmens immunes com púrpura trombocitopènica idiopàtica (PTI) o anèmia hemolítica autoimmune (AHAI). Concretament, l'AHAI per anticossos calents i la PTI tenen lloc en un 4-40% i un 1-2%, respectivament, de pacients amb LLC. En un estudi amb controls aparellats per edat, es va trobar una prevalença més elevada de limfòcits amb fenotip de LLC en pacients amb aquestes condicions autoimmunes(55). D'acord amb les guies originals, la presència d'un procés autoimmune concomitant exclou el diagnòstic de LBM i aquesta passa a la categoria de LLC(37). Malgrat això, molts d'aquests individus amb clones petites mai desenvoluparan manifestacions clíniques de SLP-B, per tant aquesta consideració de LLC s'hauria de revisar en futurs treballs.

No s'ha trobat dades consistents en la bibliografia relatives al desenvolupament de segones neoplàsies en relació amb la LBM.

## **e. APROXIMACIÓ CLÍNICA EN LA LBM**

### **i. Estudis a fer al diagnòstic de la LBM**

Com es resumeix a la taula 7, els estudis recomanats al diagnòstic varien en funció de l'immunofenotip detectat a la LBM. Així, davant d'una possible LBM-LLC s'ha de descartar LLBD mitjançant la recerca activa d'adenopaties i/o visceromegàlies. En aquest cas no es precisa TC per qüestions ja exposades anteriorment (apartat de LBM ganglionar). D'altra banda, les LBM-LLCa i LBM-no LLC s'han de diferenciar d'un LNH (limfoma no Hodgkin) descartant la presència d'adenopaties, visceromegàlies, o una TC positiva (amb presència de masses, o adenopaties superiors a 15 mm). També és recomanable valorar la infiltració de moll d'os a LBM-LLCa i LBM-no LLC, o si hi ha citopènies en el cas de LBM-LLC. En la majoria dels casos, la citopènia estarà lligada a altres causes diferents de la LBM (metàstasis, etc.)(11). Encara que la BMO (biòpsia de moll d'os) en general no està indicada a la LBM-LLC, sabem que la pràctica totalitat dels casos presenten infiltració, normalment d'un 10-20%(6) tot i que s'han descrit alguns casos amb infiltració massiva que no han requerit tractament en un seguiment de 5 anys(7). Davant d'un fenotip que pugui ser compatible amb LCM, el que a la pràctica es tradueix en tota detecció d'una població clonal CD5+ i que no sigui compatible amb LLC (LBM-LLCa), s'ha de descartar la t(11;14).

S'ha de considerar que un 20-25% de les LBM-LLC presentaran expressió de CD38, expressió de ZAP70 o IGHV no mutada. Com s'ha apuntat anteriorment, l'expressió de CD38 va ser pronòstica a les sèries de Mayo(38) i italiana(7), però no a la sèrie de Leeds(22). L'estudi italià destacava que l'estat mutacional de la IGHV és un factor pronòstic, però s'ha vist que entre les LBM-LLC que desenvolupen malaltia progressiva, hi ha més casos "mutats" que "no mutats"; probablement això és conseqüència de que la majoria de LBM-LLC tenen IGHV mutada i superen numèricament els casos no mutats quan progressen(24). Aquest fet porta a la conclusió que la valoració de factors de risc a la LBM, vista la baixa probabilitat de progressió, s'ha de valorar molt cautelosament.



Així, donat que la seva rellevància clínica no s'ha verificat, es requereixen més estudis en aquest sentit per a recomanar l'estudi sistemàtic dels factors de risc de LLC al diagnòstic de la LBM(7,22,24,38,53).

**Taula 7. Estudis recomanats a fer al diagnòstic de la LBM\***

<b>Estudi al diagnòstic</b>	<b>LBM-LLC (LBM-BR i LBM-AR)</b>	<b>LBM-LLCa</b>	<b>LBM-no LLC</b>
<b>Anamnesi: història familiar, símptomes B...</b>	Si	Si	Si
<b>Exploració física</b>	Si	Si	Si
<b>Hemograma</b>	Si	Si	Si
<b>Immunofenotip</b>	Si	Si	Si
<b>TC</b>	No	Si	Si
<b>Aspirat medul·lar</b>	No (excepte si citopènies)	Si	Si
<b>Estudi de t(11;14)</b>	No	Si	No
<b>Factors pronòstics**</b>	No	No	No

\*adaptat de Keutgens i cols.(11) \*\*s'entenen com a factors pronòstics aquells ben establerts per a LLC, ja que no hi ha factors pronòstics per a LBM ben establerts amb excepció del recompte de limfòcits B.

## ii. **Estudis a fer durant el seguiment de la LBM**

Respecte el seguiment, convé diferenciar les LBM-BR, que requereixen la realització d'un seguiment anual amb hemograma per part d'un Metge de Família, qui informará els pacients dels signes i símptomes d'alarma (símtomes B: febre, sudació nocturna, fatiga o pèrdua de pes). Contràriament, les LBM-AR, que presenten una probabilitat d'evolució amb requeriment de tractament d'1-2% a l'any, un risc augmentat d'infeccions (tres vegades respecte a la població general)(11,50) i un increment de mortalitat (reducció de 10-20% de supervivència a 10 anys)(11), han de ser seguits anualment per un hematòleg, amb hemograma i immunofenotip de sang perifèrica. Les LBM-LLCa i LBM-no LLC s'han de seguir cada 3-6 mesos (si fenotip de LNH agressiu) o anualment (si

fenotip indolent), i les proves complementàries recomanades inclouen a més una TC (mínim cada 6 mesos en el cas d'un LNH agressiu)(6,11). Veure taula 8.

**Taula 8. Estudis recomanats a fer durant el seguiment de la LBM\***

Estudis a fer	LBM-LLC (LBM-BR)	LBM-LLC (LBM-AR)	LBM-LLCa LBM-no LLC
<b>Seguiment</b>	Metge de família	Hematòleg	Hematòleg
<b>Freqüència</b>	Seguiment no indicat/ anual**	Anual	3-6 mesos (fenotip LNH agressiu) Anual (fenotip LNH indolent)
<b>Anamnesi (síntomes B)</b>	Si	Si	Si
<b>Exploració física</b>	Si	Si	Si
<b>Hemograma</b>	Si	Si (cada 6-12 mesos)	Si (cada 6-12 mesos)
<b>Immunofenotip</b>	No	Si	Si
<b>TC</b>	No	Si	Si (cada 6 mesos si LNH agressiu)

\*adaptat de Keutgens i cols.(11) \*\*no establert. TC: tomografia comoutaritzada. LBM-LLC: limfocitosi B monoclonal amb fenotip de leucèmia limfàtica crònica. LBM-BR: limfocitosi B monoclonal de baix recompte. LBM-AR: limfocitosi B monoclonal d'alt recompte. LBM-LLCa: limfocitosi B monoclonal amb fenotip de LLC atípica. LBM-no LLC: limfocitosi B monoclonal CD5 negativa. LNH: limfoma no Hodgkin.

### iii. Distinció entre LBM i LLC a la pràctica clínica

Aquells individus de nou diagnòstic de LBM, així com aquells que amb els nous criteris s'haurien de re-classificar com a LBM, s'han d'informar correctament del diagnòstic, aclarir les diferències de riscos i evolució clínica respecte a la LLC, aclarir la condició de “no maligne” i evitar termes com “pre-leucèmia” o “pre-LLC”, així com discutir les possibilitats de monitorització. La manca d'associació amb el diagnòstic de leucèmia evita les connotacions negatives relacionades amb aquest diagnòstic, i pot ajudar l'individu a explicar la seva condició.

El fet que manqui un codi ICD-9 específic per a LBM genera problemes en determinats països, ja que la codificació com a limfocitosi pot provocar problemes per a justificar el seu seguiment per part d'un especialista en Hematologia, o per justificar les diferents cobertures sanitàries, mentre que la seva designació com a LLC, deixant a part que no

és correcte, comporta els avantatges i inconvenients d'estar diagnosticat de càncer i pot, per exemple, dificultar la obtenció d'una assegurança de vida(6,11).

#### **iv. Altres aspectes clínics**

Els resultats de prevalença de LBM en estudis poblacionals ens fan plantejar el fet que s'estan acceptant donants de sang amb LBM, quan es rebutgen pacients amb neoplàsies per a la donació de qualsevol teixit, inclosos els diagnosticats de LLC. D'altra banda, la majoria de productes a transfondre actualment són irradiats o deplecionats de leucòcits amb filtres. A manca de més estudis, actualment no hi ha prou evidència per a recomanar estudi immunofenotípic de donants amb recomptes hematològics normals.

Un altre punt clau és la donació de progenitors hematopoètics per part de familiars per a tractament amb alo-transplantament d'un pacient amb LLC: hem vist la seva prevalença de 13,5-18%, fins i tot en joves(14). Tampoc hi ha consens sobre si s'ha de rebutjar sistemàticament els donants familiars amb compatibilitat HLA i diagnosticats de LBM. Probablement s'hagi de considerar les alternatives i el risc que aquestes comporten pel pacient(6,11). De fet, s'ha descrit casos de transmissió de LBM a receptors de transplantament, tant en el cas de donant emparentat com no-emparentat(56–58). Respecte a la investigació sistemàtica de LBM en donants de progenitors hematopoètics, i ha diversos grups que ho recomanen, com a mínim en majors de 40 anys(10,58). Es precisen més estudis per aclarir aquestes qüestions.

## **f. LÍNIES DE FUTUR EN LA LBM**

Tot i l'intens treball d'investigació realitzat en els darrers anys sobre la LBM, queden diferents aspectes per investigar i conceptes per aclarir.

En primer lloc, el paper de l'afectació de moll d'os en el diagnòstic de LBM, considerant que aquest pot ser una troballa en la realització de BMO per estadiatge d'altres hemopaties o neoplàsies sòlides. Tot i que manquen estudis que indiquin quins patrons d'infiltració de MO pot presentar la LBM i que aquests ens podrien ajudar a entendre la seva fisiopatologia, el percentatge d'infiltració no s'ha relacionat amb la probabilitat de progressió clínica(37). Amb aquesta premissa, i com s'ha indicat a l'apartat d'estudis recomanats al diagnòstic, les característiques de MO no afecten els criteris diagnòstics de la LBM i el grau d'infiltració no implica canvi de diagnòstic de LBM envers LLC o LLBD(10,59).

Un altre aspecte que cal destacar és el valor que es dona a la troballa d'una afectació tissular per LBM. S'ha descrit fins un 0,4% de casos de teixit prostàtic de peces de prostatectomia infiltrats per limfòcits amb fenotip de LLC(10,60) i en un 1,9% de teixit de biòpsia hepàtica(10,61) en absència d'altres criteris diagnòstics de LLC o LLBD. Pràcticament no hi ha casos descrits de progressió a SLP-B que requereixi tractament en aquests casos(10). Ja que s'ha vist influència de la LLC en l'evolució d'altres neoplàsies quan es troba en coexistència amb aquestes, s'hauria d'estudiar si passa el mateix amb les LBM. En aquestes situacions, s'hauria de definir el diagnòstic de LLBD en lloc de LBM segons l'extensió de la infiltració.

Respecte al context de malaltia autoimmune, un dels reptes a solucionar és la millor classificació de pacients amb petites clones de cèl·lules B i malaltia autoimmune associada. Com s'ha comentat prèviament, segons els criteris diagnòstics de Marti(37), s'haurien de classificar com a LLC, però posteriorment altres autors han proposat denominar-ho com a *LBM amb citopènia autoimmune associada*(10).

### III. INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

La infecció pel VHC constitueix, a dia d'avui, un problema de salut pública de primer ordre. S'estima que a nivell mundial hi ha 150-170 milions d'infectats crònics amb una incidència estimada de 30 000 noves infeccions l'any 2013 als Estats Units (dades del *Center of Disease Control and Prevention*)(62,63). La distribució geogràfica de la infecció pel VHC és global, però la seva prevalença varia notablement segons les diferents regions: aquesta és d'un 3,1-5,4% a Àsia central, Europa de l'est, nord d'Àfrica (regió centre-oest) i Àfrica subsahariana (central i oest); d'un 1-1,4% a Àfrica subsahariana sud, Europa central, Austràlia i Amèrica llatina, i baixa prevalença (0,1-0,9%) a Oceania, Carib i Europa occidental(62,64). Degut a una replicació viral amb inestabilitat genètica, existeixen diferents genotips, identificables amb estudis moleculars, que presenten una distribució global variable. Alguns d'aquests genotips s'han associat amb pitjor resposta al tractament(65). Un 75% dels malalts cronifiquen la infecció per VHC després de la infecció aguda, i si no es tracten, un de cada 5 desenvoluparà cirrosi hepàtica en els següents 20 anys (essent la majoria clínicament silenciosos fins a les fases avançades). La infecció per VHC és responsable d'un 25% de morts per cirrosi hepàtica i càncer, causant més de 500 000 morts anuals(62,66). Tot i que en els darrers anys s'han pogut introduir a la pràctica clínica diversos agents antivirals molt efectius que inclouen la curació de la infecció per VHC, continuen existint impediments per al control de la malaltia a nivell mundial: el seu cost inassolible sense una intervenció d'altas esferes (per exemple, governamental), les resistències contra els fàrmacs, l'activitat subòptima d'aquests enfront d'alguns genotips virals, i la inexistència d'una vacuna efectiva.

#### a. LBM i infecció pel VHC

A més de la seva acció hepatotròpica, el VHC és limfotròpic i afecta el compartiment de limfòcits B. Nombrosos estudis han descrit la seva associació a crioglobulinèmia mixta,

una condició benigna que pot evolucionar a limfoma en un 10% dels casos(3,65,67), així com amb la detecció de IgH clonal a sang perifèrica i diferents òrgans de pacients infectats pel VHC(68,69). La investigació sobre el limfoma associat a VHC s'ha expandit des de les associacions epidemiològiques inicials, als actuals estudis moleculars per explicar-ne la patogènesi, proporcionant en conjunt dades convincents de la relació etiològica de la infecció pel VHC amb el limfoma B(65).

Encara que l'exclusió d'una malaltia infecciosa forma part dels criteris diagnòstics de LBM proposats al 2005(5), s'accepta que les clones de cèl·lules B que es troben en pacients infectats de forma crònica per VHC es poden etiquetar com a LBM.

A l'estudi de Fazi i cols.(3) destaca una distribució atípica dels subtipus de LBM, amb un 37% de casos de LBM-LLC en el grup de VHC mentre que aquest subgrup acostuma a aproximar-se al 70% als estudis realitzats sobre població general. Les proporcions de LBM-LLCa i LBM-no LLC entre els pacients infectats per VHC va ser del 46% i 17% dels casos (figura 3). Així, es tractava de clones amb predomini fenotípic de LLC atípica, presents en el 28,5% dels casos de VHC (35 de 123 pacients avaluats), amb una proporció més elevada de tots els subtipus que en el grup control de 1725 individus sans. Aquest percentatge augmentava amb la gravetat de l'afectació hepàtica(3). No existeixen altres publicacions que investiguin específicament la presència de LBM en pacients amb infecció per VHC.

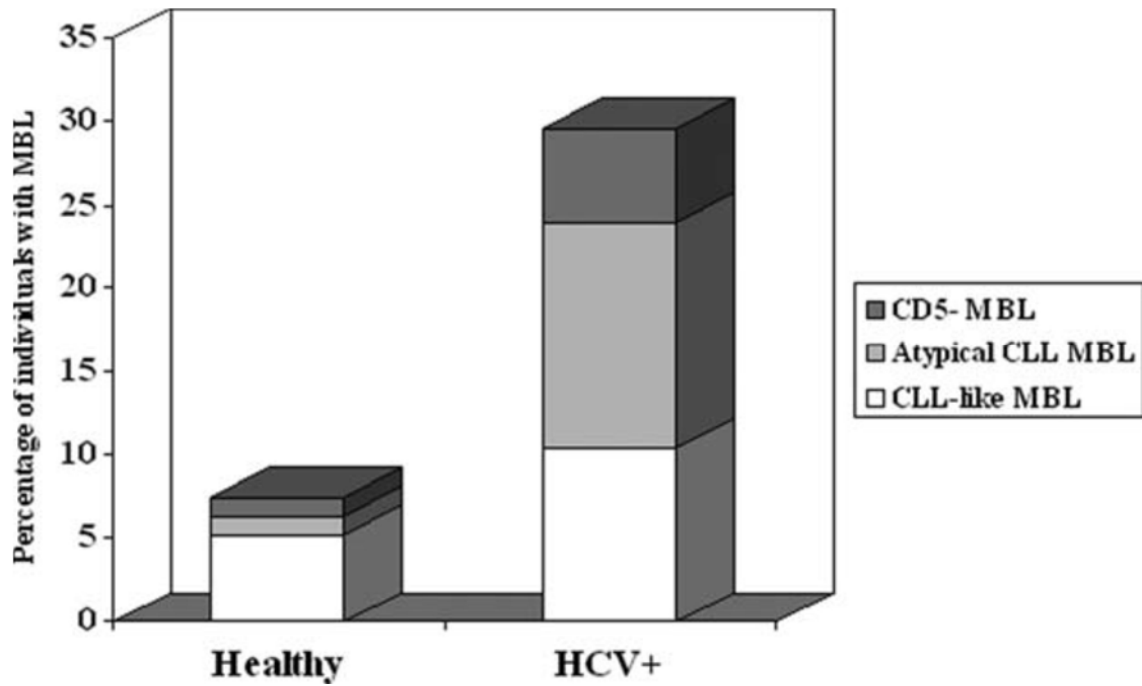
Tot i que es desconeix la causa de l'associació entre la infecció crònica per VHC i el desenvolupament de LBM, s'hi poden aplicar les mateixes hipòtesis que teoritzen sobre l'associació entre VHC i altres SLP. Una de les més acceptades és l'estimulació antigènica crònica que pateixen les cèl·lules B, per exemple a la LLC en pacients amb infecció per VHC(16,70). En relació amb aquesta hipòtesi, Landgren i cols. van demostrar un risc lleument incrementat de patir LLC en pacients amb història de pneumònia (*odds ratio* 1.4; interval de confiança del 95%, 1.2–1.8), suggerint que l'estimulació de cèl·lules B per determinats patògens respiratoris podia afavorir el

desenvolupament de la LLC. Malgrat això, els mateixos autors van proposar una teoria alternativa: la infecció respiratòria podria estar afavorida pel baix nivell d'immunoglobulines associat a una LLC encara no diagnosticada(71). Alguns autors defensen que la unió entre la proteïna E2 de l'embolcall lipídic del VHC i la molècula de superfície de limfòcits B CD81, pot ser crucial per a l'estimulació B, ja que en disminueix el llindar d'activació i proliferació, i indueix la hipermutació dels gens *IGHV* de les cèl·lules B(72,73). La infecció crònica per VHC indueix una estimulació B sostinguda i restringida a alguns isotips, com s'extreu de la revisió bibliogràfica efectuada per Libra i cols(74); aquesta estimulació B fisiològica en resposta a la infecció pot provocar la posterior expansió de cèl·lules B i desenvolupament de la LBM. A més, Conca i cols. raonen a la seva revisió que la infecció limfocítica per part del VHC podria condicionar la persistència del virus a l'organisme, degut a que constitueixen uns reservoris privilegiats que confereixen resistència tant a la defensa immune pròpia de l'organisme, com al tractament(73).

Altres autors han introduït altres possibles mecanismes causants, com pot ser la inhibició de l'apoptosi cel·lular per part dels limfòcits infectats per VHC, mitjançant la sobreexpressió de *BCL-2*(3,68).

Manquen estudis sobre factors associats a l'hoste amb MBL i factors ambientals per aclarir les causes de l'expansió de clones B.

**Figura 3. Proporció de casos de LBM entre persones sanes i pacients infectats pel VHC.**



Tots els subtipus de LBM són més freqüents entre pacients amb infecció pel VHC que a la població sana. Les columnes representen la freqüència acumulada dels 3 subtipus de LBM a la població general (columna de l'esquerra) i entre els pacients infectats per VHC (columna de la dreta), respectivament. L'increment en la freqüència de LLC atípica (gris clar) és particularment evident.

Imatge original presa de Fazi i cols(3).



## IV. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

### a. Hipòtesis

Hipòtesi 1: Podria existir un percentatge valorable de pacients reclassificables com a LBM en els casos històrics revisats. Aquests, dins de totes les síndromes limfoproliferatives B cròniques (SLPC), presentarien major supervivència lliure de tractament i supervivència global.

Hipòtesi 2: Les alteracions citogenètiques relacionades amb la LBM podrien presentar una prevalença equiparable als SLPC amb el mateix immunofenotip; aquestes els podrien conferir el mateix impacte pronòstic que als diferents SLPC.

Hipòtesi 3: L'aparició de LBM en pacients amb VHC podria associar-se a la càrrega viral i al genotip del virus, de manera que una càrrega viral elevada i els genotips 1b i 4 podrien ser factors predictius d'aparició de LBM i de la seva posterior evolució a LLC.

#### **d. Objectius**

Objectiu 1: Analitzar i descriure les característiques clínic-biològiques de la LBM en casos diagnosticats al nostre centre entre 1998 i 2011. Redefinir els casos diagnosticats de SLPC com a LBM, si s'escau.

Objectiu 2: Analitzar les alteracions citogenètiques (i particularment la translocació t[18;22]) en els casos de LBM i definir el seu significat pronòstic.

Objectiu 3: Avaluar incidència de LBM en pacients amb infecció per VHC, i analitzar la seva relació amb la càrrega viral i el genotip.

## V. PACIENTS I MÈTODES

L'estudi consta de 3 parts: a) estudi retrospectiu de pacients amb SLP-B candidats a reclassificació com a LBM, b) estudi prospectiu de LBM de nou diagnòstic, i c) estudi prospectiu de nous casos de VHC per a identificació la incidència de LBM en aquesta població.

- **Pacients**

- a. Estudi retrospectiu**

Estudi retrospectiu de pacients diagnosticats de SLP-B, provinents de l'arxiu de citometria de flux del Laboratori d'Hematologia del centre de tercer nivell Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTiP), entre els anys 1999 i 2010. Es va triar aquest període per la introducció de la tècnica estandarditzada de citometria de flux. La revisió es va realitzar consecutivament per data, de manera que es van avaluar tots els casos de limfoma/leucèmia B de baix grau amb afectació de sang perifèrica i per tant candidats a ser reclassificats com a limfocitosi B monoclonal, en funció del recompte de limfòcits B(5,42). Aquest recompte s'obtenia en cada cas prenent el percentatge de CD19 per citometria de flux respecte el total de limfòcits obtingut per l'analitzador automàtic d'hemograma.

Només es van considerar com a candidats aquells pacients als quals s'havia fet seguiment al nostre centre.

De cada pacient, es van avaluar les dades clíniques extretes de l'arxiu d'històries clíniques de l'HUGTiP (en paper o digitalitzades), o bé les dades del sistema informàtic hospitalari, a partir de l'any 2007. Aquestes havien d'incloure la simptomatologia del pacient, així com l'exploració física. Per al diagnòstic integral de laboratori d'hematologia (DILH), es van considerar les dades de citometria de flux, citològiques, citogenètiques i de biologia molecular (veure l'apartat mètodes).

A més, es van recollir dades epidemiològiques (edat, gènere), estadis Rai i Binet, dades d'hemograma al diagnòstic i a l'últim control (recompte leucocitari i limfocitari, concentració d'hemoglobina, recompte de plaquetes), dades bioquímiques (nivells de creatinina sèrica, lactat deshidrogenasa, beta-2-microglobulina), de biòpsia de moll d'os (tipus d'infiltració, presència de fibrosi), serologies del virus de la hepatitis B, VHC i virus de la immunodeficiència humana, cariotip convencional i FISH (veure mètodes), estudi de clonalitat de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgH), tipus i data de

tractament rebut, resposta al tractament, història de malaltia autoimmunitària i d'altres neoplàsies, progressió a SLP-B, causa de mort. L'estudi citogenètic per FISH no es va realitzar de forma sistemàtica en tot el període estudiat, el mateix cas que amb la biòpsia de medul·la òssia, pel que els resultats no estaven disponibles per a tots els pacients. De la mateixa manera, només alguns pacients disposaven d'estudi de clonalitat IgH.

Les dades de laboratori es van incloure si s'havien realitzat pre-tractament, des de 2 mesos abans del diagnòstic fins a 6 mesos post-diagnòstic. Com a excepció, les dades de citogenètica i FISH es van incloure amb la condició d'haver-se realitzat pre-tractament, des del diagnòstic o fins a 2 anys post-diagnòstic.

Els diagnòstics inicials candidats a reclasseficació es detallen a la taula 6. Aquests es van agrupar, per a la seva posterior comparació amb els diferents subtipus de LBM descrits a la literatura, en LLC, SLP-B CD5 negatiu i SLP-B CD5 positiu sense criteris de LLC (taula 9).

**Taula 9. Diagnòstics inicials de les síndromes limfoproliferatives B i reagrupació per a la seva comparació amb LBM.**

SLP-B	Subclassificació*
Leucèmia limfàtica crònica	LLC
Limfoma de la zona marginal	SLP-B CD5+/ SLP-B CD5-
Limfoma del mantell de baix grau	SLP-B CD5+/ SLP-B CD5-
Tricoleucèmia	SLP-B CD5+/ SLP-B CD5-
Tricoleucèmia variant	SLP-B CD5-
Limfoma folicular	SLP-B CD5+/ SLP-B CD5-
Limfoma de Wàldenstrom	SLP-B CD5-
Limfoma limfoplasmacític	SLP-B CD5+/ SLP-B CD5-
Limfoma MALT†	SLP-B CD5+/ SLP-B CD5-
Limfoma limfocític ben diferenciat	SLP-B CD5+
Limfoma B inclassificable	SLP-B CD5+/ SLP-B CD5-

\* S'especifiquen les diverses possibilitats de cada tipus de limfoma † Limfoma de teixit limfoide associat a mucosa

Basant-nos les afirmacions de Rawstron i cols. a la seva revisió al suplement especial sobre limfocitosi B monoclonal de *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, es va utilitzar el llindar de  $2.0 \times 10^9/L$  cèl·lules B per a diferenciar LBM amb baix risc de progressió (br-LBM) de LBM amb elevat risc de progressió (ar-LBM) i fer-ne la comparació de les seves característiques basals. Al citat article, els autors argumenten que aquesta és la xifra de

limfòcits B clonals a partir de la qual una LBM tendeix a augmentar gradualment el nombre de cèl·lules amb fenotip i citogenètica de LLC, mentre que per sota de  $2.0 \times 10^9$  cèl·lules B/L, la LBM es manté estable(29). Aixímateix, es van comparar els grups de LBM-BR i LBM-AR, amb el llindar descrit de  $0,5 \times 10^9/L$  cèl·lules B.

#### **b. LBM de nou diagnòstic**

Estudi prospectiu de pacients diagnosticats de SLP-B, provinents de les mostres remeses per a estudi de citometria de flux del laboratori d'hematologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTiP), a partir de l'any 2011 (aquest inclòs) i fins el 2014. Per al diagnòstic de LBM es van utilitzar els criteris diagnòstics de la OMS (42). Per a la seva anàlisi, es van recollir les mateixes dades descrites a l'apartat anterior, ampliades a l'apartat de mètodes. Els diagnòstics de LBM, en funció de les dades recopilades al DILH, es van classificar segons l'equivalent més probable de diagnòstic de SLP-B (taula 10).

**Taula 10. Diagnòstics equivalents de les LBM de nou diagnòstic i subclassificació (origen: mostres remeses a citometria de flux).**

<b>SLP-B</b>	<b>Subclassificació</b>
Leucèmia limfàtica crònica	Tipus LLC
Limfoma B inclassificable	SLP-B CD5+

#### **c. VHC de nou diagnòstic**

Estudi prospectiu de la incidència de LBM en els nous casos d'infecció per VHC a l'HUGTiP, detectats a rel de les sol·licituds de càrrega viral del VHC realitzades al sistema informàtic del laboratori (SIL). Per al diagnòstic de LBM es van utilitzar els criteris diagnòstics de la OMS (42). Per a la seva anàlisi, es van recollir les mateixes dades descrites als apartats anteriors, ampliades a l'apartat de mètodes, a més de la càrrega viral (CV) del VHC en el moment del diagnòstic de LBM i el genotip del VHC (dividit en 1a, 1b, 2, 3 i 4). La CV es va considerar negativa segons el procediment habitual del laboratori de microbiologia del nostre centre, si era inferior a 12. A efectes de comparació de CV entre els pacients que van desenvolupar LBM i els que no, es va considerar els casos negatius com a CV de 0.

Els diagnòstics de LBM, en funció de les dades recopilades pel DILH, es van classificar segons l'equivalent més probable de diagnòstic de SLP-B (taula 11).

**Taula 11. Diagnòstics equivalents de les LBM de nou diagnòstic i subclassificació (origen: VHC de nou diagnòstic).**

<b>SLP-B</b>	<b>Subclassificació</b>
Leucèmia limfàtica crònica	Tipus LLC
Limfoma de la zona marginal	SLP-B CD5+/ SLP-B CD5-

- **Mètodes**

Per al desenvolupament de l'estudi es van respectar els principis de la declaració de Helsinki.

Es va considerar LBM amb immunofenotip de LLC quan complia  $\geq 4$  punts al sistema de puntuació de Moreau, Matutes i cols.(75), o, en cas de puntuar-ne 3, es considerava conjuntament amb les dades citogenètiques i/o moleculars per al diagnòstic. El diagnòstic de LCM es confirmava en cada cas amb la demostració de la translocació t(11;14) per la tècnica de bandes G o amb la demostració de reordenament IGH/CCND1 per FISH, i es va considerar LBM amb diagnòstic equivalent de LCM quan complia tots els criteris de LBM ( $<5 \times 10^9/L$  limfòcits B, absència de signes i símptomes de SLP-B mantingut almenys 6 mesos, etc.) però el DLH era compatible amb LCM. Igualment, els casos de limfoma fol·licular es confirmaven per la demostració de la t(14;18) per citogenètica convencional o bé demostració de reordenament del gen BCL2 per FISH. El diagnòstic dels diferents SLP-B es va revisar cas a cas aplicant els criteris diagnòstics de la OMS(42) o etiquetant-ho com a SLP-B inclassificable si no complia criteris específics.

Es va considerar progressió a LLC o a SLP-B quan s'adquirien els criteris de la OMS o bé el recompte de limfòcits B superava els  $5 \times 10^9/L$ .

### **Tècnica de citometria de flux**

Per a l'estudi de citometria de flux es van utilitzar els citòmetres Coulter EPICS XL-MCL i el FC-500 (Beckman Coulter, Hialeah, FI). Partint de mostra de sang total en EDTA, es prenia 100  $\mu L$  (ajustats a 10 000 cèl·lules/ $\mu L$ ) que s'incubaven amb 5  $\mu L$  dels anticossos monoclonals corresponents durant 10 minuts a les fosques. Posteriorment es lisaven els eritròcits amb un preparat lisant (Optilyse, Beckman Coulter), es centrifugava i decantava el resultat dues vegades, i es re-suspensia en tampó fosfat salí (PBS, per les seves sigles en anglès). Es delimitava la població limfocitària, i les poblacions limfocítiques normals s'utilitzaven com a control negatiu. Els anticossos monoclonals utilitzats, les seves clones i la combinació de fluorocroms es detallen a la taula 12<sup>5</sup>:

---

<sup>5</sup> Donat que el període d'estudi és molt ampli, la incorporació dels anticossos monoclonals va ser progressiva conforme van estar disponibles comercialment. Si bé la combinació d'anticossos monoclonals que es mostra és la que es va utilitzar els darrers anys del període indicat, cal tenir en compte que el primer citòmetre de què es disposava tenia 4 colors, i no 5 com el FC-500 (Beckman Coulter)

**Taula 12. Panells d'anticossos monoclonals amb els respectius fluorocroms combinats i les clones utilitzades**

FITC	PE	ECD	PCy5	PCy7
<b>Panell bàsic</b>				
CD4	CD3	CD8	CD19	CD56
13B8.2	B9.11	UCHT1	HD37	N901
<b>Panell B</b>				
FMC7	CD23	CD19	CD5	CD38
FMC7	9P25	J4.119	SJ10.1H11	BU15
	CD200			
CD103	MRC OX-	CD19	CD22	CD11c
LF61	104	J4.119	AJ10.1H11	BU15
κ	Λ		CD19	
polyclonal	polyclonal	-	HD37	-
CD43	CD79b	CD19	CD10	CD20
DFT1	CB3-1	J4.119	ALB1	B9E9

Fluorocroms:

FITC: isotiocianat de fluoresceïna

PE: ficoeritrina

ECD: ficoeritrina aparellada amb vermell Texas

PCy5: ficoeritrina-cianina 5

PCy7: ficoeritrina-cianina 7

En funció de la sospita diagnòstica s'afegien altres marcadors, com les cadenes  $\mu$  en citoplasma en sospites de limfoma limfoplasmacític, o CD25 i CD123 en el cas de sospita de tricoleucèmia.

Es van excloure els doblats en funció de la seva relació entre l'alçada de la dispersió frontal del laser (FSC, en les seves sigles en anglès) / ratio FSC, més elevada que en els singlets.

En els casos d'infecció per VHC, es va modificar el panell bàsic per a realitzar una cerca més dirigida d'una possible LBM associada. Així, es va dissenyar la següent combinació d'anticossos monoclonals (taula 13):



**Taula 13. Panells d'anticossos monoclonals específic per als casos de VHC, amb els respectius fluorocroms combinats i les clones utilitzades**

FITC	PE	ECD	PCy5	PCy7
<b>Panell VHC</b>				
CD5	CD3	CD19	CD10	CD56
BL1a	UCHT1	J4.119	ALB1	N901

### Estudi citogenètic

L'anàlisi citogenètica es va basar en el cultiu i lectura per bandes G i l'estudi per FISH.

- **Tècnica de cultiu i lectura per bandes G**

L'objectiu de la tècnica és obtenir cèl·lules en metafase, on es poden observar els 23 parells de cromosomes al microscopi òptic.

**Cultiu de MO** (en campana de flux laminar i condicions d'esterilitat). En un flascó amb medi de cultiu (RPMI 1640, 2,5% antibiòtic, 2,5% L-glutamina, 1% heparina sòdica), suplementat en el moment d'inici del cultiu amb 1 mL de sèrum boví fetal (20% restant) i una gota de tampó HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*), s'afegia botó cel·lular per a aconseguir una concentració cel·lular de 2 a 3 x10<sup>6</sup> cèl·lules/mL. Prèviament es centrifugava a 1700 rpm durant 7-10 minuts, amb l'objectiu d'eliminar el greix (sobrenedant resultant) i s'homogeneïtzava el botó cel·lular amb la mateixa pipeta Pasteur estèril. Es cultivava 24 hores a 37°C (estufa de cultius amb un 5% de CO<sub>2</sub>, per a mantenir l'equilibri carbonat-bicarbonat).

**Cultiu de SP** (en campana de flux laminar i condicions d'esterilitat). En un flascó amb medi de cultiu (RPMI 1640, 2,5% antibiòtic, 2,5% L-glutamina, 1% heparina sòdica), es suplementava en el moment d'inici del cultiu amb 1 mL de sèrum boví fetal (20% restant) i una gota de tampó HEPES. S'afegien 50 µL de TPA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) a una concentració de 40 ng/mL, que és un mitògen específic per als limfòcits de línia B. S'ajustava la quantitat de la mostra partint de la xifra de leucòcits indicada pel comptador cel·lular, per obtenir una concentració final de 2 a 3 x10<sup>6</sup> cèl·lules/mL. Es cultivava 72 hores a 37°C (estufa de cultius amb un 5% de CO<sub>2</sub>, per a mantenir l'equilibri carbonat-bicarbonat).

**Aturada de la divisió cel·lular.** Abans de procedir a l'extracció del cultiu, s'afegia a aquest l'antimitòtic Colcemid (10 µg/mL), 50 µL durant 20 minuts als cultius no estimulats, i 150 µL durant 2 hores als cultius estimulats amb TPA.

**Xoc hipotònic.** Després de centrifugació i decantació del resultant del cultiu (1700 rpm durant 7 minuts), es rebutjava el sobrenedant i s'afegien 3-4 pipetes de KCL 0,075M (preescalfat a 37°C), resuspenent la mostra després de cada pipeta afegida. Amb l'objectiu de crear tensió osmòtica per millorar la visibilitat dels cromosomes, es deixava actuar el xoc hipotònic durant 25-30 minuts a 37°C.

**Fixació.** Es va emprar solució de Carnoy, que produeix lisi eritrocitària a més de trencar les membranes citoplasmàtiques i produir fixació cromosòmica. Després d'una nova centrifugació (1700 rpm 7 minuts) i decantació, s'afegien tres pipetes del fixador amb resuspensió i centrifugació en les mateixes condicions. Amb aquesta operació s'eliminaven les restes cel·lulars i s'obtenia un botó final que contenia les metafases i els nuclis en interfase. Amb el resultant es realitzaven les extensions a mà alçada.

**Tinció.** S'envellien les preparacions durant 1 hora a 100°C. Es realitzava immersió en la solució 2xSSC a 65°C durant 1 segon i s'aclaria amb aigua de l'aixeta. Posteriorment es tenyia amb 1 mL de colorant Wright i 3 mL de solució Sörensen per cada portaobjectes, amb temps variables segons el grau de tinció aconseguit.

La descripció del cariotip es va realitzar segons la norma ISCN (Sistema Internacional per a la Nomenclatura Citogenètica Humana, en les seves sigles en anglès) de 2009 (76). Es definia com a cariotip normal quan es llegien un mínim de 20 metafases normals.

- **Tècnica de FISH**

**Preparació de la mostra i de la sonda.** Unes hores abans de la hibridació, es realitzava l'extensió cel·lular mitjançant el llançament d'una gota a mà alçada en un portaobjectes, a partir de cèl·lules fixades amb solució de Carnoy. Amb un llapis de diamant es delimitava l'àrea d'hibridació en el portaobjectes. En el cas de portaobjectes ja tenyits per a l'estudi citogenètica amb bandes G, es destenyien en solució de Carnoy fins a la desaparició de la tinció.

Posteriorment es preparava la sonda, descongelant-la a temperatura ambient i protegida de la llum. En el cas de sondes no preparades comercialment amb tampó d'hibridació,

per a la seva aplicació directa, es preparava una solució amb 3,5 µL de tampó d'hibridació, 0,5 µL de sonda i 1 µL d'aigua destil·lada.

**Hibridació** (en cambra humida [estufa o Thermobryte], a 37°C i amb la placa d'hibridació a la temperatura recomanada pel fabricant de la sonda). S'aplicaven 5 µL de la solució amb la sonda a l'àrea d'hibridació, es cobria ràpidament amb un cobreobjectes i es fixava amb cola. Per nuclis en interfase, es desnaturalitzava durant 3 minuts a 74°C. Per a extensions destenyides, 4 minuts a 75°. Per a hibridació ràpida, 4 minuts a 85°C. Posteriorment s'incubava a 37° tota la nit o bé 2 hores en el cas d'una hibridació ràpida.

Les sondes que ho precisaven (Abbott i destenyides) es rentaven 2 minuts a 37°C amb la solució 0,4 xSSC / 0,3% NP40, després de retirar el cobreobjectes. A continuació es rentaven entre 5 i 60 segons a temperatura ambient amb la solució 2 xSSC / 0,1% NP40. S'assecaven els portaobjectes en vertical sense exposició a la llum.

**Contratinció.** S'aplicaven 10 µL de DAPI II sobre l'àrea d'hibridació, i es cobria amb un cobreobjectes. Les preparacions es conserven a -20°C protegides de la llum.

Per a l'anàlisi de resultats, es llegien les senyals d'hibridació en el microscopi de fluorescència. Segons el tipus de mostra i/o sonda es llegien entre 100 i 200 nuclis. Es va descriure els resultats segons les normes de l'ISCN 2009 (REF Shaffer et al. 2009)

Les sondes utilitzades van incloure: D12Z3, LSI P53, LSI ATM, LSI D13S319,

LAMP1 (Vysis CLL FISH probe kit, Vysis, Downers Grove), IGH/BCL2, LSI CCND1, LSI BCL6 (Vysis, Downers Grove, IL)

### **Tècnica de biologia molecular**

Per a l'anàlisi de PCR (reacció en cadena de la polimerasa, en les seves sigles en anglès), es va realitzar l'extracció de ADN amb *DNA Mini easy extraccion Kits* (Qiagen, Hilden). Per a l'estudi de cèl·lules B, es va utilitzar l'*IdentiClone™ IGH Gene C Clonality Assay* (INVIVOSCRIBE, San Diego, CA), que amplifica les regions conservades amb les regions V i J que flanquegen FR1, FR2 i FR3 per a l'anàlisi IgH. El test es va fer servir seguint les instruccions del fabricant. Per tal de verificar la integritat i quantitat d'ADN, es van utilitzar els marcadors de qualitat i mida de mostra, inclosos a l'equip. Es van incloure controls clonal i policlonal, així com tubs de control negatiu per tal d'evitar falsos positius per contaminació de la mostra. Les condicions de PCR van ser: un cicle a 95°C durant 7 minuts, 35 cicles de (45 segons a 95°C, seguit de 45 segons a 60°C,

seguit de 90 segons a 72°C) i un pas final d'extensió a 72°C durant 10 minuts. Es va realitzar l'anàlisi de fragments a un seqüenciador 3130 Applied Biosystems (Genescan). Quan s'amplificava ADN d'una població cel·lular normal o reactiva, es produïa una corba de distribució gaussiana del producte d'amplificació, dins d'un rang de mida esperable, i el resultat de la PCR s'informava com a policlonal. Si s'observava la presència d'un o dos amplicons prominents, amb una mida determinada esperable i un fons normal o disminuït i policlonal, el resultat de la PCR s'informava com a policlonal. Es va considerar el resultat de la PCR com a policlonal però no concloent quan el pic era entre dues i tres vegades més alt que el tercer pic més alt sense arribar al límit de la clonalitat. En aquests casos, es sol·licitava nova mostra per a fer un nou control. Es considerava un resultat com a no informatiu quan no es llegien productes específics per a cap dels objectius de IgH, però els controls de qualitat eren correctes.

Per a l'anàlisi de la càrrega viral (laboratori de microbiologia) s'utilitzava la tècnica de PCR a temps real i el resultat s'expressava en logaritme en base 10. Aixímateix, per a l'estudi del genotipat del VHC també s'utilitzava la PCR a temps real.

### **Anàlisi estadística**

Es va realitzar una anàlisi retrospectiva de les característiques basals de la sèrie global. Les variables quantitatives es van expressar com a promig (desviació estàndar, DE) o mediana (extrems) i les variables qualitatives com a freqüència i percentatge. Per a les comparacions entre pacients (br-LBM *versus* ar-LBM) es van utilitzar el test de la *Chi-quadrat* i el test exacte de *Fisher* (per a variables categòriques) i el test de la T de *Student*, U de *Mann-Whitney* o test de la mediana (per a variables quantitatives).

Es va utilitzar el mètode de *Kaplan-Meier*(77) per a les corbes de supervivència, i el test de log-rank(78) per a comparacions. La supervivència global (SG) es va mesurar des del moment del diagnòstic fins al moment de la defunció o darrer control. La supervivència lliure de progressió (SLP) es va definir com el temps transcorregut des del diagnòstic fins a la progressió a SLP-B o fins el darrer control. La progressió o mort per qualsevol causa es van considerar com a esdeveniments. La probabilitat de segona neoplàsia es va calcular utilitzant la funció d'incidència cumulativa i es va comparar amb el test de Gray. Es va analitzar la segona neoplàsia i la mort per qualsevol altra causa com a riscos competitius. El nivell de significació estadística es va establir com a  $P < .05$ . Les anàlisis estadístiques es van realitzar amb els *softwares* SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) v24.0 i R 3.3.2.

## VI. RESULTATS

### Estudi retrospectiu

#### Descriptiva dels casos reclassificats com a LBM

Es van revisar 547 pacients amb SLP-B i afectació de sang perifèrica. Cent vint-i-nou (23,6%) es van reclassificar com a LBM, dels quals 69 eren homes i 60 dones (1,15:1). L'edat mediana va ser de 73 anys (extrems 42-95). Les proporcions de LBM-LLC, LBM-LLCa i LBM-noLLC van ser de 80% (n=103), 2% (n=3) i 18% (n=23), respectivament. Les proporcions dels seus SLP-B equivalents considerant el DILH van ser de 63% (n=264) LLC, 15% (n=64) SLP-B CD5+ i 22% (n=90) SLP-B CD5- (taules 14 i 15).

Taula 14. Reclassificació i subtipus dels SLP-B seleccionats.

N (%)	TOTAL	Subtipus LLC	Subtipus LLCa (CD5+)	Subtipus no-LLC (CD5-)
<b>LBM</b>	129 (23,6)	103 (79,9)	3 (2,3)	23 (17,8)
<b>SLPC-B</b>	418 (76,4)	264 (63,2)	64 (15,3)	90 (21,5)

Taula 15. Característiques dels pacients: globals i segons el recompte limfocitari B

Característiques		TOTAL	Limfòcits B ≤2x10 <sup>9</sup> /L	Limfòcits B >2x10 <sup>9</sup> /L
Nombre de pacients (%)		129	23 (17,8)	106 (82,2)
Edat	Mediana (extrems)	73 (42-95)	72 (45-95)	73 (42-94)
Gènere: n (%)	Homes	69 (54)	12	57
	Dones	60 (46)	11	49
Classificació: n (%)	LBM-LLC	103 (80)	15	88
	LBM-LLCa	3 (2)	0	3
	LBM-noLLC	23 (18)	8	15
RLT (x10 <sup>9</sup> /L)	Promig (DE)	11.5 (3.9)	10.3 (6.9)	11.8 (2.9)
RLi (x10 <sup>9</sup> /L)	Promig (DE)	5.6 (1.6)	3.4 (1.2)	6.1 (1.2)
RLiB (x10 <sup>9</sup> /L)	Promig (DE)	3.0 (1.1)		
Hemoglobina (g/L)	Promig (DE)	135 (19)	129 (24)	136 (18)
Plaquetes (x10 <sup>9</sup> /L)	Promig (DE)	206 (73)	197 (106)	208 (64)
Creatinina	Promig (DE)	1.1 (0.7)	0.9 (0.5)	1.1 (0.7)
β2- microglobulina	Promig (DE)	2.3 (1.6)	2.3 (0.7)	2.3 (1.8)
LDH	Promig (DE)	288 (112)	268 (76)	294 (121)
IGHV (n <sup>1</sup> )	Clonal	14	2	12
	Oligoclonal	1	0	1
VHC (n <sup>2</sup> )	Infecció	7	4	3
	Negatiu	58	9	49
Cariotip n <sup>3</sup> (%)	Alterat	27 (29)	5	22
	Normal	67 (71)	11	56
Segona neoplàsia n <sup>4</sup> (%)		33 (26)	6 (26)	27 (26)
Malaltia autoimmunitària n <sup>5</sup> (%)		14 (11)	4 (17)	10 (9)

LBM-LLC, limfocitosi B monoclonal amb fenotip de leucèmia limfàtica crònica. LBM-LLCa, limfocitosi B monoclonal amb fenotip de leucèmia limfàtica crònica atípica. LBM-noLLC, limfocitosi B monoclonal CD5 negativa. RLT recompte leucocitari total. DE, desviació estàndard. RLi, recompte limfocitari. RLiB, recompte limfocitari B. LDH, lactate dehydrogenase. IGHV, regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines. VHC, virus de la hepatitis C.

<sup>1</sup>Casos avaluables: 15 <sup>2</sup>Casos avaluables: 65 <sup>3</sup>Casos avaluables: 98 <sup>4</sup>Casos avaluables: 126  
<sup>5</sup>Casos avaluables: 125

El patró d'infiltració de MO predominant va ser l'intersticial (41% dels casos), seguit del mixt (nodular-intersticial), 33% dels casos, i del nodular (18% dels casos). El patró d'infiltració difús va ser molt infreqüent (taula 16).

**Taula 16. Distribució dels patrons d'infiltració de moll d'os segons l'immunofenotip\***

n	Infiltració intersticial	Infiltració mixta intersticial/nodular	Infiltració nodular	Infiltració difusa	No es detecta infiltració
LBM-LLC	12	11	7	1	7
LBM-LLCa	0	1	0	1	0
LBM no-LLC	4	1	1	0	1

\*Les dades de BMO estaven disponibles en 47 pacients.

Només 7 dels 67 pacients amb dades disponibles (10%) tenien anticossos contra el VHC en el moment del diagnòstic. Cal destacar un dels casos, un home de 79 anys al diagnòstic de LBM-LLC, que va desenvolupar un carcinoma hepatocel·lular als 37 mesos del diagnòstic de LBM-AR, i a més va presentar múltiples carcinomes cutanis (amb histologia de carcinoma basocel·lular) 10 mesos abans del diagnòstic. Aquest pacient va patir una anèmia hemolítica autoimmunitària (AHAI) 44 mesos després del diagnòstic de la LBM, motiu pel qual es va iniciar tractament corticoide a dosis elevades; després de dos mesos de tractament, va morir als 89 anys per pneumònia broncoaspirativa. La seva LBM-LLC mai va progressar a SLP-B.

De 56 i 60 casos amb informació disponible, respectivament, no es va trobar co-infeccions per virus de la hepatitis B ni per virus de la immunodeficiència humana.

## A DESTACAR

- Es van reclassificar un 23,6% dels SLP-B revisats, dels quals un 80% corresponien a LBM-LLC.
- Els patrons d'infiltració de MO més comuns van ser l'intersticial i el mixt.
- Un 10% dels pacients presentava infecció per VHC.

## Estudi citogenètic

Respecte a l'estudi citogenètic, es disposava de dades de cariotip convencional de 94 pacients, i FISH de 67 pacients (dels quals només 2 no disposaven del cariotip). En global, es van trobar alteracions citogenètiques en 61 pacients (64%).

Si només es consideren els diagnosticats de LBM-LLC, 43 pacients (42%) presentaven alteracions citogenètiques.

Així, del total de casos estudiats, la distribució de les alteracions va ser:

- del(13)(q14.1) 45,2% dels casos
- +12 11,3% dels casos
- t(14;18)(q32;q21) 5,9% dels casos
- del(11)(q23) 3,5% dels casos

Si prenem només els casos de LBM-LLC, la distribució de les alteracions va ser:

- del(13)(q14.1) 30% dels casos
- +12 5,8% dels casos
- t(14;18)(q32;q21) 1% dels casos
- del(11)(q23) 2% dels casos
- altres 4,9% dels casos

L'estudi de reordenament del gen *BCL2* per FISH es va realitzar en només 17 casos. Els 3,5% dels casos amb deleció del gen *ATM* o del(11)(q23) descrits corresponen a 2 casos de LBM-LLC que a més presentaven del(13)(q14.1). Ambdós van assolir els criteris diagnòstics de LLC en 2 anys (21 i 22 mesos). Un d'ells va requerir intervenció terapèutica per progressió a LLC amb criteris de tractament, i el segon per desenvolupament de AHA1.

No es van trobar casos amb el gen *P53* alterat per FISH.

## A DESTACAR

- Un 64% de les LBM presentava alteracions citogenètiques, amb predomini clar de la del(13)(q14.1)
- Es van trobar dos casos (3,5%) de LBM-LLC amb deleció del gen *ATM*, de mal pronòstic en LLC



## **Evolució**

En el que ateny a la progressió, 66 casos (52,8%) van complir criteris d'evolució a SLP-B, 18 dels quals (15%) van requerir tractament. D'aquests, 10 es van tractar per progressió a LLC. El promig (DE) de limfòcits B al diagnòstic de pacients amb progressió a SLP-B va ser de  $3.5 \times 10^9/L$  ( $1.0 \times 10^9/L$ ) en front a un  $2.6 \times 10^9/L$  ( $1.1 \times 10^9/L$ ) en aquells que no van progressar,  $p < 0.0001$ .

Trenta-tres pacients (26%) van ser diagnosticats d'una segona neoplàsia, més habitualment abans del diagnòstic de LBM. L'interval promig entre el diagnòstic de l'altra neoplàsia i el de la LBM va ser de 4,3 anys (DE 3,6). L'origen més freqüent de la segona neoplàsia va ser: cutani, colorectal i pulmó, seguit de pròstata i mama. Quatre casos van desenvolupar més d'una neoplàsia, dels quals 2 les van presentar tant abans com després del diagnòstic de LBM; un cas va presentar adenocarcinoma de colon, carcinoma basocel·lular i hepatocarcinoma. Taula 17.

Catorze pacients (11,2%) presentaren una malaltia autoimmunitària, tant abans (n=7) com després (n=7) del diagnòstic de LBM. Concretament, el diagnòstic més freqüent va ser el de AHAI (n=3). Taula 17.

**Taula 17. Segones neoplàsies i malalties autoimmunitàries en pacients amb LBM.**

Origen de neoplàsia/ tipus de MAI	Pre-LBM (n) <sup>1</sup>	Post-LBM (n) <sup>2</sup>	Total
Cutani*	4	3	7
Colorectal	3	2	5
Pulmó	3	2	5
Pròstata	2	3	5
Origen desconegut	2	3	5
Mama	3	0	3
Tracte urinari	1	1	2
Hepatocel·lular	1	0	1
Limfoma de Hodgkin	0	1	1
AHAI	1	2	3
PTI	2	0	2
Anèmia perniciosa	0	2	2
Fenomen de Raynaud	1	1	2
Polymyalgia Rheumatica	1	1	2
Hipotiroidisme autoimmunitari	0	1	1
Psoriasi i uveïtis	1	0	1
MAI desconeguda	1	0	1

MAI, malaltia autoimmunitària. LBM, limfocitosi B monoclonal. AHAI, anèmia hemolítica autoimmunitària. PTI, purpura trombocitopènica immune.

\*neoplàsies cutànies: 4 carcinomes basocel·lulars, 1 carcinoma escatós, 1 melanoma maligne.

<sup>1</sup>Mediana de temps entre la 2<sup>a</sup> neoplàsia i el diagnòstic de LBM: 4,18 anys (extrems 0,02-21,62). Mediana de temps des de la MAI al diagnòstic de LBM: 3,81 anys (extrems 0,00-23,31). <sup>2</sup>Mediana de temps des del diagnòstic de LBM a la segona neoplàsia: 3,56 anys (0,07-26,02). Mediana de temps entre el diagnòstic de LBM i el desenvolupament de MAI: 6,1 anys (1,42-11,54).

L'estudi molecular del reordenament de la IgH es va realitzar en només 15 dels 129 pacients. Un sol cas presentava un pic oligoclonal (és a dir, que no superava entre 2 i 3 vegades l'alçada del segon pic de la línia base). Al contrari del que s'esperava, corresponia a una ar-LBM.

En la comparació de pacients amb br-LBM-BR i ar-LBM (lindar de  $2 \times 10^9/L$ ), es van trobar diferències en la incidència d'infecció per VHC, que va resultar molt més elevada en pacients amb br-LBM (30,1% *versus* 5,8%,  $p=0,025$ ).

Sis dels 7 pacients amb infecció per VHC presentaven el subtipus LBM-LLC. El cas restant era una LBM amb característiques fenotípiques de LZM, CD5 negatiu.

#### A DESTACAR

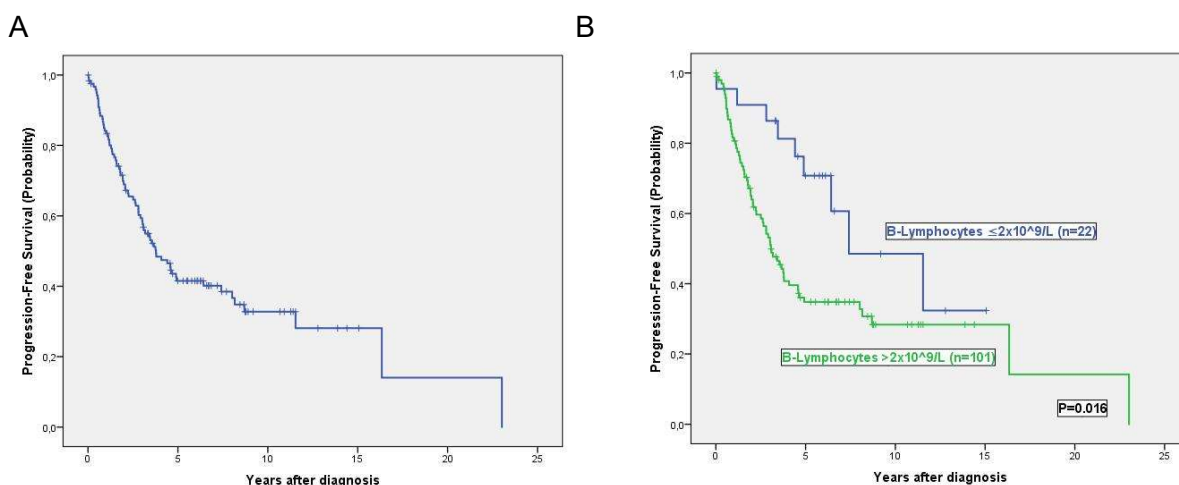
- Un 52,8% de les LBM van progressar a SLP-B, amb una xifra de limfòcits al diagnòstic més elevada que els que no van progressar. Només 10 pacients van requerir tractament per LLC.
- Un de cada quatre pacients (26%) va presentar una altra neoplàsia, més freqüentment abans del diagnòstic.
- Un 11,2% dels pacients va presentar MAI abans o després del diagnòstic.
- En un de 15 pacients avaluats (7%) es va demostrar oligoclonalitat per biologia molecular.

La probabilitat de supervivència lliure de progressió (SvLP) als 15 anys va resultar del 28% (interval de confiança [IC] 95%, 16%-40%), amb una mediana de SvLP de 3,8 anys (IC 95%, 2,6-5,0) (Figura 4). La probabilitat de SLT als 15 anys va ser del 78% (IC 95%, 65%-91%), amb una mediana de SLT de 23,02 anys (IC 95% no calculable) (Figura 5). La probabilitat de SG als 15 anys va ser del 68% (IC 95%, 55%-81%), amb una mediana de SG de 16,3 anys (IC 95%, 9,6%-23%) i una mediana de seguiment de pacients vius de 6,7 anys (extrems 0-15,9) (Figura 6). No es van trobar diferències respecte a la supervivència global entre els grups de br-LBM i ar-LBM; en canvi, es van trobar diferències significatives en la SvLP, que va ser significativament més elevada al grup de br-LBM (mediana 7,4 *versus* 3,1 anys) ( $p=0,016$ )

La probabilitat de desenvolupament de segona neoplàsia a 15 anys, tenint en compte per a l'anàlisi els riscos competitius, va ser del 19% (IC 95% 10%-30%), sense diferències significatives entre br-LBM i ar-LBM.

Només es van trobar 5 casos amb menys de  $0,5 \times 10^9/L$  limfòcits B, pel que l'anàlisi comparatiu de LBM-BR i LBM-AR no es va realitzar.

**Figura 5. Probabilitat de supervivència lliure de progressió als 15 anys, a la sèrie global (A) i anàlisi per separat de br-LBM i ar-LBM (B)**

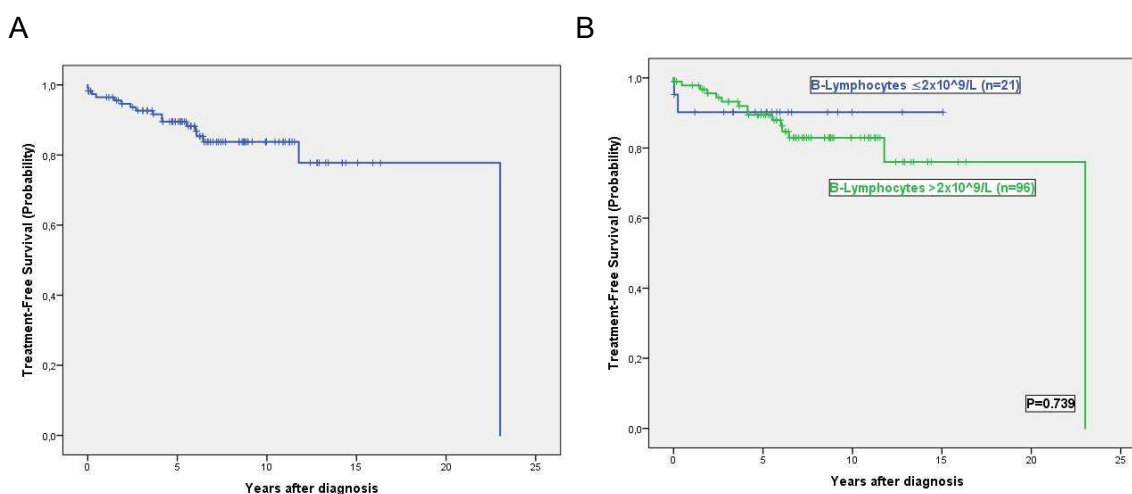


La supervivència lliure de progressió (SLP) a 15 anys va ser del 28% (IC 95% 16-40), amb una mediana de SLP de 3,8 anys (CI 95% 2,6-5,0).

	<b>br-LBM (n=22)</b>	<b>ar-LBM (n=101)</b>
SLP a 15 anys (IC 95%)	32% (0 - 64)	28% (18 - 38)
Mediana SLP (IC 95%), anys	7,4 (2,1 – 12,7)	3,1 (2,3- 3,9)

Es van trobar diferències significatives comparant els grups de baix i elevat risc de progressió (p=0,016).

**Figura 6. Probabilitat de supervivència lliure de tractament als 15 anys, a la sèrie global (A) i anàlisi per separat de br-LBM i ar-LBM (B)**

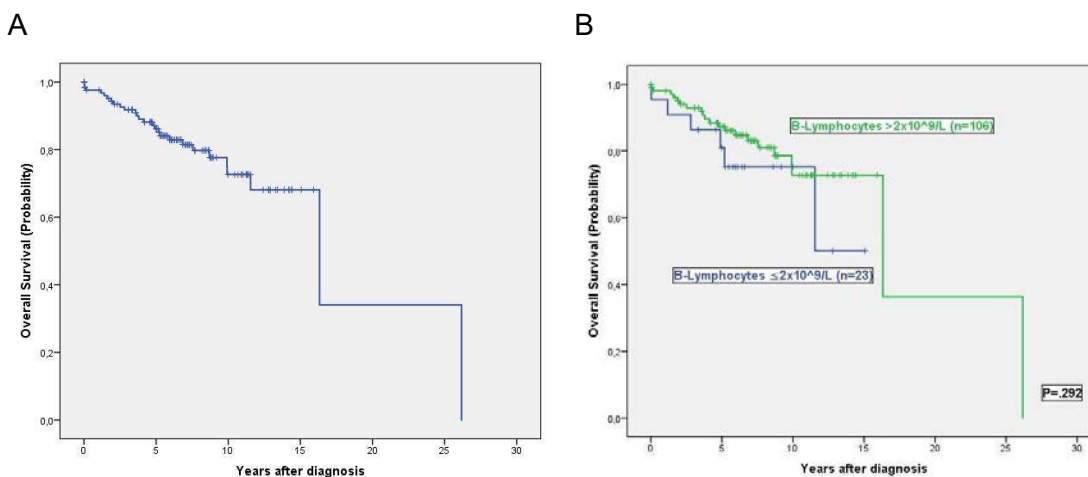


La supervivència lliure de tractament (SLT) a 15 anys va ser del 78% (IC 95% 65-91), amb una mediana de 23,02 anys.

	<b>br-LBM (n=21)</b>	<b>ar-LBM (n=96)</b>
SLT a 15 anys (IC 95%)	90% (77 - 100)	76% (61 - 91)
Mediana SLT (IC 95%), anys	No s'aconsegueix	23,0 (no es pot calcular)

No es van trobar diferències significatives comparant els grups de baix i elevat risc de progressió (p=0,739).

**Figura 7. Probabilitat de supervivència global de la sèrie global (A) i anàlisi per separat de br-LBM i ar-LBM (B)**



La supervivència global a 15 anys (SG) de la sèrie global va ser de 68% (IC 95% 55-81), amb una mediana de 16,3 anys (extrems: 9,6-23,0), i una mediana de seguiment de pacients vius de 6,7 anys (extrems 0-15,9).

	<b>br -LBM (n=23)</b>	<b>ar-LBM (n=106)</b>
SG a 15 anys (IC 95%)	50% (8 - 92)	73% (61 - 85)
Mediana SG (IC 95%), anys	No s'aconsegueix	16,3 (7,4 – 25,3)

No es van trobar diferències significatives comparant els grups de baix i elevat risc de progressió (p=0,292).

#### A DESTACAR

- La probabilitat de SLT a 15 anys va ser d'un 78%, i la probabilitat de SG a 15 anys va ser d'un 68%, sense diferències entre els grups de ar-LBM i br-LBM.
- La probabilitat de desenvolupament d'una altra neoplàsia a 15 anys va ser del 19%

## LBM de nou diagnòstic

Des de l'any 2008, a rel de la publicació dels nous criteris de la OMS per al diagnòstic de LLC i altres SLP-B amb el límit de 5000 limfòcits B(42), es va començar a etiquetar els pacients pertinents com a LBM.

Aquests, però, no es van començar a recollir de forma prospectiva fins a l'any 2011, moment en què es va començar el present estudi.

En total, es van recollir 15 casos entre els anys 2011 i 2014 dels quals 14 (93%) es van diagnosticar de LBM-LLC i el darrer cas de LBM-LLCa. L'edat mediana va ser de 69 anys (extrems 54-88). En aquest grup les alteracions citogenètiques van ser molt més freqüents que a l'estudi retrospectiu: 11 casos (73%) van presentar alteracions a l'estudi per FISH (taula 18).

**Taula 18. Resultats dels estudis per hibridació *in situ* fluorescent (FISH) dels casos de limfocitosi B monoclonal diagnosticats a partir de l'any 2011 (expressats en percentatge de nuclis amb l'alteració).**

Pacient	del(13) (q14.3) %	t(18;?) (q21 ;?) %	t(14;?) (q32;?) %	del(17) (p13.1) %	del(11) (q22-q23) %	trisomia 12 %
1	0	-2	-2	0	0	0
2	19	0	0	0	0	0
3	0	ND	ND	0	0	0
4	20	ND	ND	0	0	0
5	90	ND	ND	0	0	0
6	10	ND	ND	0	0	0
7	0	0	0	0	0	55
8	0	44	POS	0	0	43
9	74	0	0	0	0	0
10	0	0	ND	ND	0	0
11	0	0	0	0	48	33
12	26	0	0	0	0	0
13	0	ND	ND	0	0	0
14	0	0	90	0	0	0
15	25	-2	-2	0	0	0

ND, dada no disponible. POS, positiu no disponible numèricament.

Com era d'esperar per l'elevada freqüència del subtipus LBM-LLC, l'alteració més freqüent va ser la del(13)(q14.3), trobada en 7 casos (46,7%), seguida de la trisomia 12 (3 casos, 20%) i de la translocació del gen *IGH* (2 casos, 13,3%, un d'ells traslocat amb *BCL2*). Cal destacar un nou cas amb deleció de gen *ATM* o del(11)(q22-q23), que habitualment és molt infreqüent en les sèries de LBM. En aquest cas, a diferència dels 2 casos descrits a l'estudi retrospectiu, que es trobaven associats a del(13), es troba associat a trisomia 12. En el moment de tancar l'estudi, després de 36 mesos del seu diagnòstic, el pacient no havia progressat a SLP-B.

Cap dels pacients va progressar ni va requerir tractament en tancar l'estudi (mediana de seguiment de 28 mesos, extrems 0-39). Tampoc va haver-hi cap defunció.

#### A DESTACAR

- Un 93% dels pacients de l'estudi prospectiu van ser etiquetats com a LBM-LLC.
- Un 73% de les LBM de l'estudi prospectiu presentaven alteracions citogenètiques.
- Es va descriure un nou cas de deleció del gen *ATM*, associat a trisomia del cromosoma 12 i que no va evolucionar a SLP-B en els 36 mesos de seguiment.



## VHC de nou diagnòstic

Es van recollir 160 pacients amb infecció per VHC utilitzant com a font les sol·licituds de càrrega viral (CV) del VHC realitzades al SIL. A tots ells se'ls va realitzar un estudi de citometria de flux amb la combinació d'anticossos monoclonals descrita a l'apartat "mètodes" (taula 13).

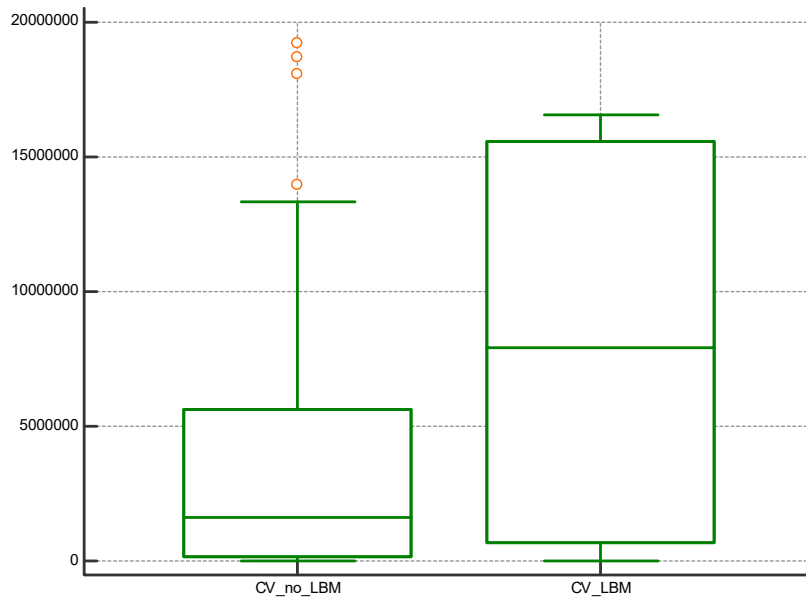
Mitjançant aquesta metodologia es van diagnosticar 14 LBM (8,75%). L'edat mediana va ser de 55 anys (extrems 24-73 anys), amb 9 homes i 5 dones. Pel que fa als diagnòstics, 8 (57%) corresponien a LBM-LLC, 5 a LBM-no LLC (CD5 negatiu, 36%) i 1 LBM-LLCa (CD5+) (7%), aquesta darrera amb immunofenotip compatible amb LZM.

El promig de limfòcits total al diagnòstic va ser de  $2029 \times 10^9/L$  (DE 979), i el promig de limfòcits B va ser de 360 (358).

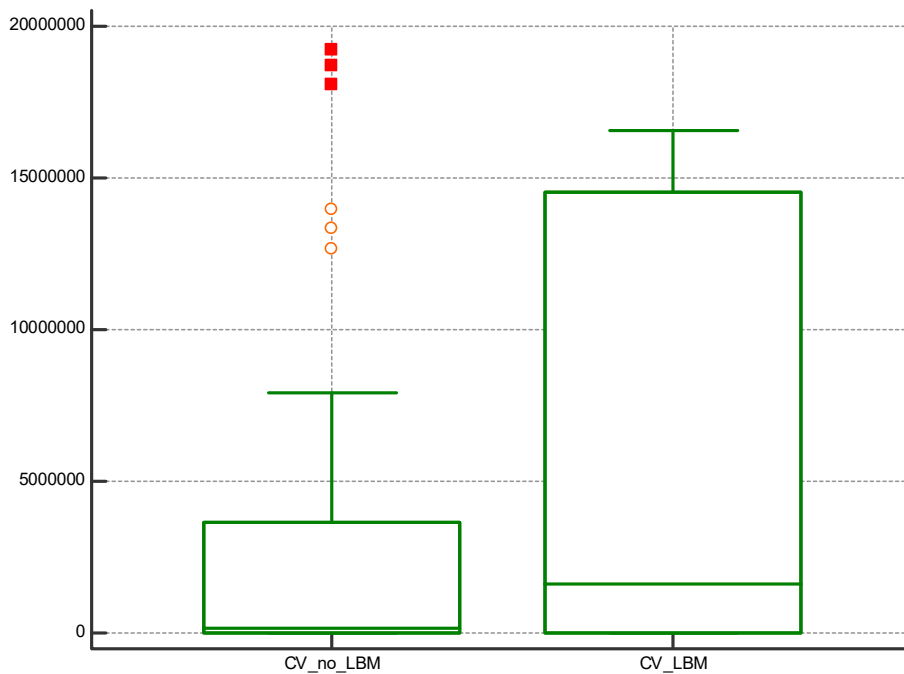
Es va poder realitzar estudi citogenètic (FISH) en 5 pacients, resultant normal en tots els casos excepte un cas d'un home amb LBM-LZM que va presentar la translocació del gen *IGH*. En no realitzar-se a tècnica de cultiu i lectura de bandes G, no es va poder verificar amb quin altre gen es trobava traslocat.

Respecte a la càrrega viral, es va comparar entre el grup en que s'havia detectat una LBM i el grup que no, per tal de valorar si es tractava d'un factor de risc per al desenvolupament d'aquesta. No es va confirmar aquesta associació, però es suggereix una tendència a una major CV en els casos diagnosticats de LBM, amb una mediana de 7937521,5 (9411-16554379) *versus* 1614067 (17-19196327),  $p=0,098$  (figura 8). Per a aquesta primera anàlisi, es van excloure els casos amb CV negativa en el moment del diagnòstic de la LBM. Si s'inclouïen els casos amb CV  $<12$  (considerant aquest valor com a 0), tampoc es confirmava l'associació entre aparició de LBM i CV més elevada amb una mediana de 1591185 (0-16554379) de CV a les LBM, *versus* 151734 (0-19196327) a la resta (figura 9).

**Figura 8. Representació de Box and Whisker per a la comparació càrrega viral del VHC entre els pacients amb LBM i els que no la presenten (s'ha exclòs els pacients amb CV negativa)**



**Figura 9. Representació de Box and Whisker per a la comparació càrrega viral del VHC entre els pacients amb LBM i els que no la presenten (s'ha considerat els valors de CV negativa com a un valor de 0)**

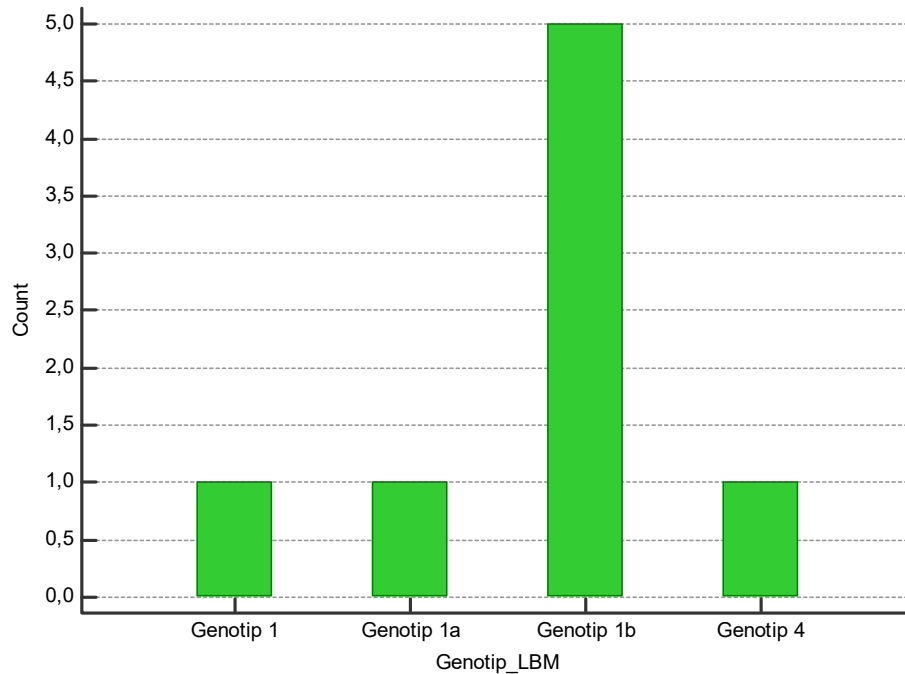


Dels genotips virals la comparació entre grups és menys fiable, ja que dels que presentaven LBM associada a la infecció per VHC (n=14), només disposem de 8 genotips. No es confirma l'associació entre els genotips 1b i 4 (que confereixen pitjor pronòstic als pacient amb infecció de VHC), amb més desenvolupament de LBM, amb un valor de  $\chi^2$  de 7,0 (graus de llibertat=6, p=0,32, coeficient de contingència=0,73).

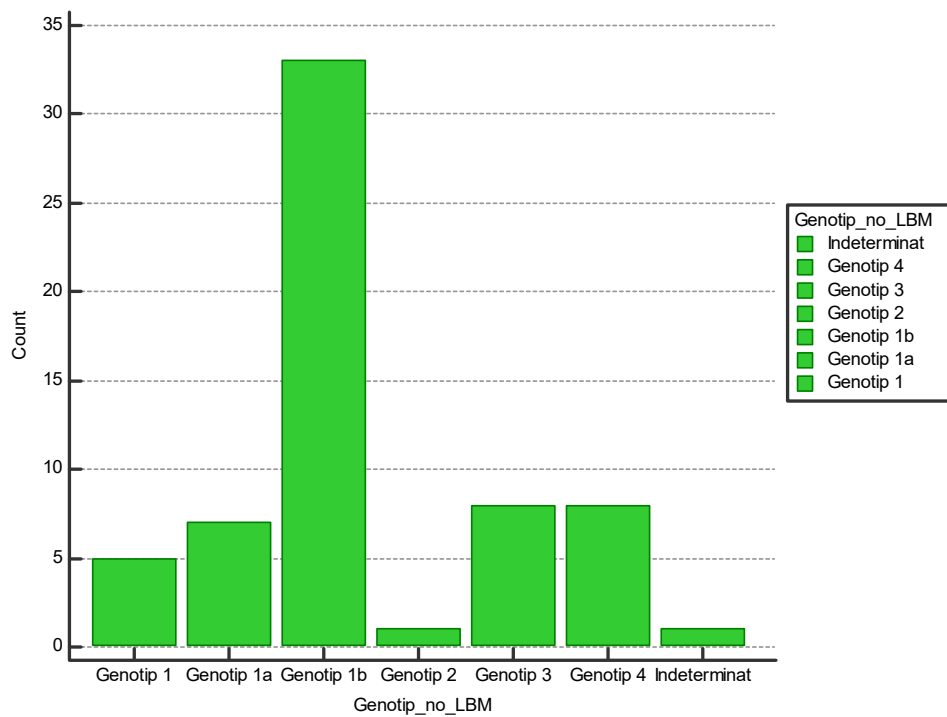
De nou, la observació de la distribució dels subtipus indueix a pensar que en una sèrie més representativa aquesta associació es podria confirmar, tot i que aquesta afirmació és molt interpretable (figura 10).

**Figura 10. Distribució de freqüències dels diferents genotips de VHC al grup de pacients amb infecció per VHC que va desenvolupar LBM (A) i el grup que no (B)**

A



B



## A DESTACAR

- De 160 pacients amb infecció crònica per VHC (activa o no), es va demostrar presència de LBM en 14 casos (8,75%).
- La distribució dels diagnòstics dels 14 pacients amb LBM va ser: 57% LBM-LLC, 36% LBM-no LLC i 7% LBM-LLCa.
- No es va trobar associació entre la CV del VHC i la probabilitat de desenvolupar LBM, encara que es pot interpretar una tendència positiva.
- No es va trobar associació entre uns genotips del VHC en concret i la probabilitat de desenvolupar LBM.

## VII. DISCUSSIÓ

En la present tesi, es van revisar 547 pacients amb síndrome limfoproliferativa B de l'arxiu de citometria de flux de l'Hospital Germans Trias i Pujol. Pràcticament un de cada quatre (23,5%) es va reclassificar com a LBM. A la primera part de la tesi es realitza una descripció de les característiques basals, que inclou les característiques genètiques i el patró d'infiltració de moll d'os. El patró d'infiltració predominant va ser l'intersticial. Entre les troballes més destacables, es descriuen dos casos de deleció del gen ATM, descrits molt rarament entre les LBM. Respecte a les dades d'evolució, es descriu una elevada proporció de neoplàsies secundàries i malalties autoimmunitàries associades, tant en els casos de ar-LBM com en els de br-LBM.

Centrant-nos més en el detall, cal destacar que les proporcions de LBM-LLC, LBM-LLCa i LBM-noLLC (80%, 2% i 18%) van ser similars a aquelles descrites a la bibliografia revisada, amb una certa desviació cap a una proporció més elevada de LBM-LLC. La proporció descrita de LBM-LLC entre els casos de LBM és d'un 68-78%, i aquest percentatge augmenta amb l'edat(3,9,30).

A l'actual revisió, vam observar una associació més forta entre la infecció per VHC i el grup de br-LBM que amb el grup d'ar-LBM, però aquesta constatació no és conclouent, ja que només van ser valorables un total de 15 casos. Tot i això, la incidència del primer grup va ser més similar a la descrita als articles publicats prèviament: Fazi i cols. van trobar fins a un 28,5% de casos amb infecció pel VHC(3,11).

Fins ara, pel nostre coneixement, només hi ha un estudi que descriu amb detall els patrons d'infiltració de MO a la LBM(79). Nelson i cols. van descriure tres patrons d'infiltració a la LBM: infiltració limfoide focal intersticial (descrita només a LBM-LLC típica o atípica), agregats limfoides arrodonits i no paratrabeculars, i limfocitosi difusa discreta(79,80). En el nostre cas vam descriure, com a patrons més freqüents, la

infiltració intersticial, infiltració nodular o focal arrodonida, i el patró mixt en els casos amb biòpsia de MO. A la nostra sèrie, el patró intersticial no es va limitar a LBM-LLC o a LBM-LLCa, com van trobar Nelson i cols. La absència de dades sobre el patró d'infiltració de MO es pot explicar per la naturalesa indolent de la LBM en si mateixa, de manera que pel seu diagnòstic els metges eviten fer tècniques invasives.

Com era d'esperar, en la sèrie revisada les anomalies cromosòmiques van ser les mateixes que aquelles observades a LLC Rai0. Vam trobar alteracions genètiques en un 64% de la sèrie global però només en un 55% en la LBM-LLC (en contrast amb el 80% descrit per a LLC)(42,81). Com a particularitat d'aquesta sèrie, es van trobar 2 casos de LBM-LLC amb deleció del cromosoma 13(q14.1) a més de deleció del cromosoma 11q. Ambdós van assolir els criteris diagnòstics de LLC en 2 anys aproximadament, requerint tractament. Rawstron i el seu equip(29) van mostrar que aquestes alteracions cromosòmiques de mal pronòstic es trobaven presents en petites proporcions dels nuclis estudiats per FISH (<20%). Un dels pacients de la nostra sèrie tenia el 55% dels nuclis amb la deleció del gen *ATM*, i l'altre cas un 10% dels nuclis.

Varis autors han arribat a la conclusió de que l'únic factor relacionat amb la progressió de la LLC és el recompte absolut de limfòcits. Aquest fet es va confirmar a la nostra sèrie, on els pacients del grup global que van progressar a SLP-B, van presentar un recompte absolut de cèl·lules B al diagnòstic de LBM més elevat que el que van presentar els pacients que no van progressar. Aquest fet es va constatar prenent conjuntament tots els subtipus de LBM, el que amplia en part l'evidència actual, referida sobretot al subgrup de LBM-LLC.

La freqüència de segona neoplàsia va ser d'un 26% en la present sèrie, el que indica una elevada prevalença de dos neoplàsies concomitants (o pre-neoplàsia en el cas de la LBM d'alt recompte), comparada amb la població general ajustada per edat(82). Com ja s'ha descrit en LLC, el tipus de neoplàsia més freqüent en el nostre grup de LBM va ser el cutani(83,84), però en aquest cas va ser similar a l'origen colorectal i pulmó. Cal

destacar que el risc de segona neoplàsia va ser el mateix pels grups de ar-LBM i br-LBM. No s'ha trobat altres articles que explorin les neoplàsies associades a LBM. Només un grup, Rodríguez-Caballero i cols., van descriure la presència d'alteracions relacionades amb síndrome mielodisplàsica en pacients amb ar-LBM-LLC(85). Per aquesta raó, vàrem pensar que convenia revisar sistemàticament la presència de segones neoplàsies en pacients diagnosticats de LBM.

S'ha descrit una prevalença més elevada de limfòcits amb immunofenotip de LLC en pacients amb AHAI i PTI, en comparació amb un grup aparellat per edat(55). Aquesta constatació ens podria ajudar a entendre la incidència més elevada de malalties autoimmunitàries (MAI) en la nostra sèrie, comparada amb la de la població general (17:100 000)(86).

Tenint en compte que la majoria de LLC son monoclonals, és interessant conèixer la monoclonalitat o oligoclonalitat de les LBM de cara a entendre la seva fisiopatologia, i en concret en aquest cas, si la LBM representa una LLC indolent o bé un precursor diferent pre-maligne previ al desenvolupament de la LLC. Lanasa i el seu grup van trobar que moltes LBM són oligoclonals, estudiant-les mitjançant FISH i anàlisi de seqüència de les immunoglobulines a cèl·lules individuals, i que algunes LBM van demostrar diversificació oligoclonal, el que suggereix mecanismes guiats per antigen. Així, van concloure que la LBM-LLC es compon de cèl·lules B CD5+ pauci-clonals i amb potencial de progressió LLC(87). A la nostra sèrie, que es compon d'un elevat percentatge de ar-LBM, només un dels escassos casos analitzats va demostrar oligoclonalitat per biologia molecular.

La majoria dels nostres pacients va evolucionar a LLC o altres SLP-B amb una mediana de SLP de 3,8 anys, amb diferències significatives entre ar-LBM i br-LBM. Pocs casos van requerir tractament. Respecte a la SG d'un 68%, i considerant tots els subgrups diagnòstics, els nostres resultats concorden amb les dades publicades. Keutgens i cols.



van referir un risc de mortalitat de 10 – 20% a la ar-LBM (supervivència a 5 anys del 45% a LBM-LLCa, 69% a LBM-LLC i 57% a LBM-no LLC)(11).

La principal limitació de l'estudi és el fet de ser retrospectiu, i la limitació de dades disponibles en molts dels pacients. Malgrat l'extensiu seguiment, la manca de dades, especialment citogenètiques, no permet treure més conclusions.

Resumint, amb l'estudi retrospectiu presentem una sèrie de pacients representativa d'un hospital de tercer nivell, reclassificant quasi un quart dels pacients diagnosticats prèviament de LLC. La majoria de LBM tenia marcadors compatibles amb LLC, i l'alteració citogenètica més freqüent va ser la del(13)(q14.1). En destaquem una elevada taxa de progressió (per sobre del 50%) dels quals un 15% va requerir tractament.

Introduïm alguns esdeveniments que poden tenir lloc durant l'evolució: una segona neoplàsia, el que pot succeir amb una freqüència inesperadament alta (26%), i una incidència de MAI associada d'un de cada 10 pacients.

## VIII. CONCLUSIONS

- Es presenta una sèrie representativa de pacients amb LBM, d'un hospital de tercer nivell, reclassificant com a mínim un quart dels diagnosticats prèviament de SLP-B.
- La majoria de las LBM tenia marcadors compatibles amb LLC, essent l'alteració citogenètica més freqüent la del(13)(q14.1). Es va observar una elevada taxa de progressió (per sobre del 50%), uns 15% dels quals van requerir tractament.
- Es descriu una elevada taxa de segona neoplàsia, afectant el 26% dels casos de LBM, i una incidència de MAI d'un de cada 10 pacients.

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Vogt RF, Shim YK, Middleton DC, Buffler PA, Campolucci SS, Lybarger JA, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis as a biomarker in environmental health studies. *Br J Haematol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2015 Sep 5];139(5):690–700. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2007.06861.x/epdf>
2. Shim YK, Vogt RF, Middleton D, Abbasi F, Slade B, Lee KY, et al. Prevalence and natural history of monoclonal and polyclonal B-cell lymphocytosis in a residential adult population. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet]. 2007 Sep [cited 2015 Sep 5];72(5):344–53. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.20174/epdf>
3. Fazi C, Dagklis A, Cottini F, Scarfò L, Bertilaccio MTS, Finazzi R, et al. Monoclonal B cell lymphocytosis in hepatitis C virus infected individuals. *Cytom Part B - Clin Cytom* [Internet]. 2010;78(SUPPL. 1):61–8. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.20545/epdf>
4. Carbonari M, Caprini E, Tedesco T, Mazzetta F, Tocco V, Casato M, et al. Hepatitis C virus drives the unconstrained monoclonal expansion of VH1-69-expressing memory B cells in type II cryoglobulinemia: a model of infection-driven lymphomagenesis. *J Immunol* [Internet]. 2005 May 15 [cited 2016 Sep 2];174(10):6532–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879157>
5. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, Kay NE, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* [Internet]. 2005;130:325–32. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2005.05550.x/abstract;jsessionid=9EF939F86A29160933687EC97CC6E805.f04t04>

6. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia* [Internet]. 2010 Mar [cited 2015 Sep 6];24(3):512–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3913172/>
7. Rossi D, Sozzi E, Puma A, De Paoli L, Rasi S, Spina V, et al. The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br J Haematol*. 2009;146:64–75.
8. Almeida J, Nieto WG, Teodosio C, Pedreira CE, López A, Fernández-Navarro P, et al. CLL-like B-lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* [Internet]. 2011;25:718–22. Available from: <http://www.nature.com/leu/journal/v25/n4/full/leu2010305a.html>
9. Shim YK, Middleton DC, Caporaso NE, Rachel JM, Landgren O, Abbasi F, et al. Prevalence of monoclonal B-cell lymphocytosis: A systematic review. *Cytom Part B - Clin Cytom* [Internet]. 2010;78(SUPPL. 1):10–8. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.20538/epdf>
10. Strati P, Shanafelt TD. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood* [Internet]. 2015 Jul 23 [cited 2016 Aug 25];126(4):454–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26065657>
11. Keutgens A, Foguene J, Gothot A, Tassin F. [Monoclonal B-cell lymphocytosis: from literature to laboratory practice]. *Ann Biol Clin (Paris)* [Internet]. 2016 [cited 2016 Aug 25];74(2):168–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27029722>
12. Edlefsen KL, Cherian S, De Roos AJ, Getaneh A, Lessin L, Li W, et al. Detection

- of non-CLL-like monoclonal B cell lymphocytosis increases dramatically in the very elderly, while detection of CLL-like populations varies by race: findings in a multiethnic population-based cohort of elderly women. *Ann Hematol* [Internet]. 2016 Oct [cited 2016 Oct 22];95(10):1695–704. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27468854>
13. Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton JAL, Evans PA s, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of “indolent” chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts [Internet]. *Blood*. 2002 [cited 2015 Sep 6]. p. 635–9. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/100/2/635.full.pdf?sso-checked=true>
  14. Marti GE, Carter P, Abbasi F, Washington GC, Jain N, Zenger VE, et al. B-cell monoclonal lymphocytosis and B-cell abnormalities in the setting of familial B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet]. 2003 Mar [cited 2015 Sep 5];52(1):1–12. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.10013/epdf>
  15. Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, Cullen M, Kennedy B, Richards SJ, et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion [Internet]. *Blood*. 2002 [cited 2015 Sep 5]. p. 2289–90. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/100/7/2289.full.pdf>
  16. Mowery YM, Lanasa MC. Clinical aspects of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Cancer Control* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Oct 20];19(1):8–17. Available from: [https://www.moffitt.org/File\\_Library/Main\\_Nav/Research\\_and\\_Clinical\\_Trials/Cancer\\_Control\\_Journal/v19n1/8.pdf](https://www.moffitt.org/File_Library/Main_Nav/Research_and_Clinical_Trials/Cancer_Control_Journal/v19n1/8.pdf)
  17. Wiernik PH, Ashwin M, Hu XP, Paietta E, Brown K. Anticipation in familial chronic

- lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2001 May [cited 2016 Nov 1];113(2):407–14. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2141.2001.02773.x/epdf>
18. Ishibe N, Sgambati MT, Fontaine L, Goldin LR, Jain N, Weissman N, et al. Clinical Characteristics of Familial B-CLL in the National Cancer Institute Familial Registry. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2001 Jan [cited 2016 Nov 1];42(1–2):99–108. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10428190109097681>
19. Rachel JM, Zucker ML, Fox CM, Plapp F V, Menitove JE, Abbasi F, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis in blood donors. *Br J Haematol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2016 Sep 3];139(5):832–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17961190>
20. Dagklis A, Fazi C, Sala C, Cantarelli V, Scielzo C, Massacane R, et al. The immunoglobulin gene repertoire of low-count chronic lymphocytic leukemia (CLL)-like monoclonal B lymphocytosis is different from CLL: diagnostic implications for clinical monitoring. *Blood* [Internet]. 2009 Jul 2 [cited 2016 Sep 3];114(1):26–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029437>
21. Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, López A, Henriques AF, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* [Internet]. 2009 Jul 2 [cited 2016 Sep 3];114(1):33–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19420353>
22. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton J a L, Plummer M, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008;359:575–83.

23. Ghia P, Prato G, Scielzo C, Stella S, Geuna M, Guida G, et al. Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood* [Internet]. 2004 Mar 15 [cited 2015 Sep 7];103(6):2337–42. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/103/6/2337.abstract>
24. Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* [Internet]. 2009 [cited 2016 Oct 17];430–9. Available from: <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2009/1/430.full.pdf+html>
25. Rawstron AC, Bennett F, Hillmen P. The biological and clinical relationship between CD5+23+ monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2015 Sep 7];139(5):724–9. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2007.06863.x/epdf>
26. Dagklis A, Fazi C, Sala C, Cantarelli V, Scielzo C, Massacane R, et al. The immunoglobulin gene repertoire of low-count chronic lymphocytic leukemia (CLL)-like monoclonal B lymphocytosis is different from CLL: diagnostic implications for clinical monitoring. *Blood* [Internet]. 2009;114(1):26–32. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/114/1/26.full.pdf>
27. Lanasa MC, Allgood SD, Slager SL, Camp N, Spector L, Rassenti L, et al. Family-Associated Monoclonal B Lymphocytosis Is Commonly Oligoclonal and Expresses Markers Associated with Adverse Risk in CLL. *Blood*. 2008;112(11).
28. Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, Call TG, Zent CS, Maddocks K, et al. Brief report: natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* [Internet]. 2009 Aug 20 [cited 2016 Oct 23];27(24):3959–63. Available from: <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.are.uab.cat/pmc/articles/PMC2734397/pdf/zlj3959.pdf>

29. Rawstron AC, Shanafelt T, Lanasa MC, Landgren O, Hanson C, Orfao A, et al. Different biology and clinical outcome according to the absolute numbers of clonal B-cells in monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Cytom Part B - Clin Cytom* [Internet]. 2010;78(SUPPL. 1):19–23. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.20533/epdf>
30. Scarfò L, Fazi C, Ghia P. MBL versus CLL: how important is the distinction? *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2013 Apr [cited 2016 Aug 25];27(2):251–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23561472>
31. Dagklis A, Fazi C, Scarfo L, Apollonio B, Ghia P. Monoclonal B lymphocytosis in the general population. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2009 Mar [cited 2016 Sep 27];50(3):490–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19347732>
32. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra M, Scielzo C, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2016 Sep 27];111(3):1524–33. Available from: <http://www.bloodjournal.org.ars.uab.cat/content/bloodjournal/111/3/1524.full.pdf>
33. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjogra M, Guida G, Smilevska T, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2016 Sep 27];109(1):259–70. Available from: <http://www.bloodjournal.org.ars.uab.cat/content/bloodjournal/109/1/259.full.pdf>
34. Rasi S, Monti S, Spina V, Foa R, Gaidano G, Rossi D. Analysis of NOTCH1 mutations in monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2017 May 11];97(1):153–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993686>



35. Greco M, Capello D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Monti S, et al. Analysis of *SF3B1* mutations in monoclonal B-cell lymphocytosis. *Hematol Oncol* [Internet]. 2013 Mar [cited 2017 May 11];31(1):54–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461140>
36. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* [Internet]. 1996 Jun 15 [cited 2016 Sep 27];87(12):4990–7. Available from: <http://www.bloodjournal.org.ares.uab.cat/content/bloodjournal/87/12/4990.full.pdf>
37. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, Kay N, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* [Internet]. 2005 Aug [cited 2016 Aug 31];130(3):325–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16042682>
38. Shanafelt TD, Kay NE, Jenkins G, Call TG, Zent CS, Jelinek DF, et al. B-cell count and survival: Differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-cell lymphocytosis based on clinical outcome. *Blood*. 2009;113:4188–96.
39. te Raa GD, Tonino SH, Remmerswaal EBM, van Houte AJ, Koene HR, van Oers MH, et al. Chronic lymphocytic leukemia specific T-cell subset alterations are clone-size dependent and not present in monoclonal B lymphocytosis. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2012 Nov [cited 2016 Sep 30];53(11):2321–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22646856>  
<http://www.tandfonline.com.ares.uab.cat/doi/full/10.3109/10428194.2012.698277>
40. Gentile M, Cutrona G, Fabris S, Pesce EA, Baldini L, Di Raimondo F, et al. Total body computed tomography scan in the initial work-up of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: Results of the prospective, multicenter O-CLL1-

- GISL study. *Am J Hematol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2017 May 11];88(7):539–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23553682>
41. Nieto WG, Teodosio C, López A, Rodríguez-Caballero A, Romero A, Bárcena P, et al. Non-CLL-like monoclonal B-Cell lymphocytosis in the general population: Prevalence and phenotypic/genetic characteristics. *Cytom Part B - Clin Cytom* [Internet]. 2010;78(SUPPL. 1). Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.20543/epdf>
  42. Swerdlow, SH. Campo, E. Lee Harris, N. Jaffe, ES. Pileri, SA. Stein, H. Thiele, J. Vardiman J, editor. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. 438 p.
  43. Amato D, Oscier DG, Davis Z, Mould S, Zheng J, Kolomietz E, et al. Cytogenetic aberrations and immunoglobulin VH gene mutations in clinically benign CD5-monoclonal B-cell lymphocytosis. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2007 Aug [cited 2016 Oct 20];128(2):333–8. Available from: <http://ajcp.oxfordjournals.org/content/ajcpath/128/2/333.full.pdf>
  44. Landgren O, Albitar M, Ma W, Abbasi F, Hayes RB, Ghia P, et al. B-cell clones as Early Markers for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2009;(360):659–567. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0806122>
  45. Crowther-Swanepoel D, Corre T, Lloyd A, Gaidano G, Olver B, Bennett FL, et al. Inherited genetic susceptibility to monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood* [Internet]. 2010 Dec 23 [cited 2016 Oct 26];116(26):5957–60. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/116/26/5957.full.pdf>
  46. Marti GE, Carter P, Abbasi F, Washington GC, Jain N, Zenger VE, et al. B-cell monoclonal lymphocytosis and B-cell abnormalities in the setting of familial B-cell

- chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet]. 2003 Mar [cited 2015 Sep 5];52(1):1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12599176>
47. Goldin LR, Lanasa MC, Slager SL, Cerhan JR, Vachon CM, Strom SS, et al. Common occurrence of monoclonal B-cell lymphocytosis among members of high-risk CLL families. *Br J Haematol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2016 Oct 24];151(2):152–8. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.pmc/articles/PMC2966536/pdf/nihms230867.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2966536/pdf/nihms230867.pdf)
48. Matos DM, Ismael SJ, Scrideli CA, de Oliveira FM, Rego EM, Falcão RP. Monoclonal B-cell lymphocytosis in first-degree relatives of patients with sporadic (non-familial) chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2016 Oct 26];147(3):339–46. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2009.07861.x/epdf>
49. Anderson LA, Landgren O, Engels EA. Common community acquired infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2016 Aug 31];147(4):444–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19725826>
50. Casabonne D, Almeida J, Nieto WG, Romero A, Fernández-Navarro P, Rodriguez-Caballero A, et al. Common infectious agents and monoclonal B-cell lymphocytosis: a cross-sectional epidemiological study among healthy adults. *PLoS One* [Internet]. 2012 [cited 2016 Oct 26];7(12):e52808. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3532166/pdf/pone.0052808.pdf>
51. Fung SS, Hillier KL, Leger CS, Sandhu I, Vickars LM, Galbraith PF, et al. Clinical progression and outcome of patients with monoclonal B-cell lymphocytosis. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(June):1087–91.
52. Mulligan CS, Thomas ME, Mulligan SP. Monoclonal B-cell lymphocytosis and

- chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2008 Nov 6 [cited 2016 Oct 26];359(19):2065–6; author reply 2066. Available from: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMc086211>
53. Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, Call TG, Zent CS, Maddocks K, et al. Brief report: natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* [Internet]. 2009 Aug 20 [cited 2015 Sep 5];27(24):3959–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2734397&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
54. Marti GE, Abbasi F, Raveche E, Rawstron AC, Ghia P, Aurrant T, et al. Overview of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2007;139:701–8.
55. Mittal S, Blaylock MG, Culligan DJ, Barker RN, Vickers MA. A high rate of CLL phenotype lymphocytes in autoimmune hemolytic anemia and immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica* [Internet]. 2008 Jan [cited 2016 Aug 25];93(1):151–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18166805>
56. Perz JB, Ritgen M, Moos M, Ho AD, Kneba M, Dreger P. Occurrence of donor-derived CLL 8 years after sibling donor SCT for CML. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2008 Nov 4 [cited 2016 Nov 22];42(10):687–8. Available from: <http://www.nature.com.aren.uab.cat/bmt/journal/v42/n10/pdf/bmt2008230a.pdf>
57. Hardy NM, Grady C, Pentz R, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Fontaine LS, et al. Bioethical considerations of monoclonal B-cell lymphocytosis: donor transfer after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2016 Nov 22];139(5):824–31. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com.aren.uab.cat/doi/10.1111/j.1365-2141.2007.06862.x/epdf>

58. Ferrand C, Garnache-Ottou F, Collonge-Rame MA, Larosa F, Blanc M, Behar C, et al. Systematic donor blood qualification by flow cytometry would have been able to avoid CLL-type MBL transmission after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2016 Nov 22];88(3):269–72. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0609.2011.01741.x/epdf>
59. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, 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* [Internet]. 2008 Jun 15 [cited 2016 Nov 22];111(12):5446–56. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/111/12/5446.full.pdf>
60. He H, Cheng L, Weiss LM, Chu PG. Clinical outcome of incidental pelvic node malignant B-cell lymphomas discovered at the time of radical prostatectomy. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2007 Jan [cited 2016 Nov 22];48(10):1976–80. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10428190701584007?needAccess=true>
61. LIU C, FAN S, LO C, CHAN S, TSO W, NG I, et al. Hepatic resection for incidentaloma. *J Gastrointest Surg* [Internet]. 2004 Nov 1 [cited 2016 Nov 22];8(7):785–93. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1091255X04002318>
62. Trucchi C, Orsi A, Alicino C, Sticchi L, Icardi G, Ansaldi F. State of the Art, Unresolved Issues, and Future Research Directions in the Fight against Hepatitis C Virus: Perspectives for Screening, Diagnostics of Resistances, and

- Immunization. *J Immunol Res* [Internet]. 2016 [cited 2016 Nov 30];2016:1–19. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2016/1412840/>
63. Commentary | U.S. 2013 Surveillance Data for Viral Hepatitis | Statistics & Surveillance | Division of Viral Hepatitis | CDC [Internet]. Available from: <http://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2013surveillance/commentary.htm#hepatitisC>
64. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol* [Internet]. 2014 Nov [cited 2016 Nov 30];61(1):S45–57. Available from: [http://ac.els-cdn.com/are.uab.cat/S0168827814005261/1-s2.0-S0168827814005261-main.pdf?\\_tid=9fa15778-b6f5-11e6-b2b3-00000aacb35d&acdnat=1480507854\\_1fe2efd119488ad7d6ef798e3c8575d8](http://ac.els-cdn.com/are.uab.cat/S0168827814005261/1-s2.0-S0168827814005261-main.pdf?_tid=9fa15778-b6f5-11e6-b2b3-00000aacb35d&acdnat=1480507854_1fe2efd119488ad7d6ef798e3c8575d8)
65. Viswanatha DS, Dogan A. Hepatitis C virus and lymphoma. *J Clin Pathol* [Internet]. 2006 Dec 20 [cited 2017 Apr 16];60(12):1378–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042694>
66. Thein H-H, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology* [Internet]. 2008 Aug [cited 2016 Nov 30];48(2):418–31. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.22375/epdf>
67. Monti G, Pioltelli P, Saccardo F, Campanini M, Candela M, Cavallero G, et al. Incidence and characteristics of non-Hodgkin lymphomas in a multicenter case file of patients with hepatitis C virus-related symptomatic mixed cryoglobulinemias. *Arch Intern Med* [Internet]. 2005 Jan 10 [cited 2017 Apr 13];165(1):101–5. Available from: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.165.1.101>

68. Zuckerman E, Zuckerman T, Sahar D, Streichman S, Attias D, Sabo E, et al. bcl-2 and immunoglobulin gene rearrangement in patients with hepatitis C virus infection. *Br J Haematol* [Internet]. 2001 Feb [cited 2017 Apr 15];112(2):364–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167830>
69. Vallat L, Benhamou Y, Gutierrez M, Ghillani P, Hercher C, Thibault V, et al. Clonal B cell populations in the blood and liver of patients with chronic hepatitis C virus infection. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2004 Nov [cited 2017 Apr 15];50(11):3668–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15529359>
70. Klein U, Dalla-Favera R. New insights into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2016 Dec 7];20(6):377–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029776>
71. Landgren O, Rapkin JS, Caporaso NE, Mellekjaer L, Gridley G, Goldin LR, et al. Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* [Internet]. 2007 Mar 1 [cited 2017 Apr 7];109(5):2198–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082317>
72. Machida K, Cheng KT-H, Pavio N, Sung VM-H, Lai MMC. Hepatitis C virus E2-CD81 interaction induces hypermutation of the immunoglobulin gene in B cells. *J Virol* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2017 Apr 11];79(13):8079–89. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.79.13.8079-8089.2005>
73. Conca P, Tarantino G. Hepatitis C virus lymphotropism and peculiar immunological phenotype: effects on natural history and antiviral therapy. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2009 May 21 [cited 2017 Apr 11];15(19):2305–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19452570>
74. Libra M, Gasparotto D, Gloghini A, Navolanic PM, De Re V, Carbone A. Hepatitis C virus (HCV) infection and lymphoproliferative disorders. *Front Biosci* [Internet]. 2005 [cited 2017 May 11];10:2460–71. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970508>

75. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1997 Oct [cited 2017 May 29];108(4):378–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9322589>
76. Shaffer LG, Slovak ML, Campbel LL. *ISCN 2009: An international system for human cytogenetic nomenclature*. Basel: Karger; 2009.
77. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. Source *J Am Stat Assoc* [Internet]. 1958 [cited 2016 Aug 30];53(282):457–81. Available from: <http://www.jstor.org/stable/2281868>
78. Peto, R. Pike M. Conservatism of the approximation  $S(OE)^2/E$  in the log-rank test for survival data or tumour incidence data. *Biometrics*. 1973;29:579–84.
79. Nelson BP, Abdul-Nabi A, Goolsby C, Winter J, Peterson L. Characterization of tissue findings in bone marrow biopsy specimens with small monoclonal B-cell populations. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2014 May [cited 2016 Aug 30];141(5):687–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24713740>
80. Randen U, Tierens AM, Tjønnfjord GE, Delabie J, Han T, Ozer H, et al. Bone marrow histology in monoclonal B-cell lymphocytosis shows various B-cell infiltration patterns. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2013 Mar [cited 2016 Aug 25];139(3):390–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23429376>
81. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2000 Dec 28 [cited 2016 Aug 30];343(26):1910–6. Available from:



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136261>

82. SEOM. Las cifras del cáncer en España 2014 [Internet]. 2014. Available from: [http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las\\_cifras\\_del\\_cancer\\_2014.pdf](http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_cifras_del_cancer_2014.pdf)
83. Manusow D, Weinerman BH. Subsequent neoplasia in chronic lymphocytic leukemia. JAMA [Internet]. 1975 Apr 21 [cited 2016 Aug 30];232(3):267–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/47401>
84. Mansfield AS, Rabe KG, Slager SL, Schwager SM, Call TG, Brewer JD, et al. Skin cancer surveillance and malignancies of the skin in a community-dwelling cohort of patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia. J Oncol Pract [Internet]. 2014 Jan [cited 2016 Sep 1];10(1):e1-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23981385>
85. Rodríguez-Caballero A, Henriques A, Criado I, Langerak AW, Matarraz S, López A, et al. Subjects with chronic lymphocytic leukaemia-like B-cell clones with stereotyped B-cell receptors frequently show MDS-associated phenotypes on myeloid cells. Br J Haematol [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Sep 1];168(2):258–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25252186>
86. Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A, Radice T, Nichele I, Di Bona E, et al. Clinical heterogeneity and predictors of outcome in primary autoimmune hemolytic anemia: a GIMEMA study of 308 patients. Blood [Internet]. 2014 Nov 6 [cited 2016 Aug 30];124(19):2930–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25232059>
87. Lanasa MC, Allgood SD, Volkheimer AD, Gockerman JP, Whitesides JF, Goodman BK, et al. Single-cell analysis reveals oligoclonality among “low-count” monoclonal B-cell lymphocytosis. Leukemia [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Aug 24];24(1):133–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19946263>

88. Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, Call TG, Zent CS, Schwager SM, et al. Survival of patients with clinically identified monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) relative to the age- and sex-matched general population. *Leukemia* [Internet]. 2012 Feb 12 [cited 2016 Oct 31];26(2):373–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/leu.2011.211>