

## Estudi del fenomen de la transformació histològica a les síndromes limfoproliferatives indolents

Eva Giné Soca

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.





ESTUDI DEL FENOMEN DE LA TRANSFORMACIÓ HISTOLÒGICA  
A LES SÍNDROMES LIMFOPROLIFERATIVES INDOLENTS

Tesi presentada per

**Eva Giné Soca**

Per optar al grau de Doctora en Medicina

Codirectors: Dr. Armando López Guillermo i Dr. Francesc Bosch Albareda

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Barcelona, 2010



Als meus pares i germans,  
el millor tresor de la meva vida

Als projectes de recerca no reeixits

A aquella part de mi que ja no hi és



*La patience est amère, mais son fruit est doux*

Jean-Jacques Rousseau

Fa vuit anys va començar l'aventura que avui finalitza. S'ha hagut de recórrer un llarg camí, no sempre planer, amb alguns revolts inesperats que han acabat per modificar el projecte original. Tot i les dificultats, l'arribada al final d'aquest trajecte m'ha sorprès però amb un sentiment dolç i serè, de tranquil·litat per la feina ben feta i de satisfacció per la promesa complerta.

Aquest viatge ha estat ple d'aprenentatges i de mestres diferents. La primera llavor la dec al Joan Xavier Comella. Ell fou el responsable d'ensenyar-me l'abecé de la recerca al laboratori durant els meus anys d'estudiant a la Facultat de Medicina. Allí em va encomanar la curiositat per desxifrar els mecanismes biològics dels processos que condueixen a les malalties i, d'aquesta manera m'influencià en el propòsit d'obtenir algun dia una tesi doctoral de caire biològic.

L'oportunitat d'elaborar la tesi arribà de la mà d'en Francesc Bosch, un sorprenent metge apassionat per la biologia i l'estadística. Malgrat que alguns dels projectes que vam iniciar no van arribar a fer-se realitat, tota la paciència i la perseverança esmerçades segur que no han estat en debades. M'agrada pensar que en aquest procés d'aprenentatge científic he après de tu a fer-me les preguntes adequades i a trobar les respostes justes.

He d'agrair de forma especial al Toni Martínez que, en un dels giravolts del camí d'aquesta tesi, va tenir l'encert de rescatar un antic projecte i no tan sols me'l va oferir, sinó que la seva intuïció en el procés de recreació va permetre que aquest arribés finalment a bon port.



I com en tota bona història aquesta tesi té un fil conductor. Tan fi que de vegades ni es percep, però tan fonamental que sense ell aquest final no hauria estat possible. A l'Armando López Guillermo li he d'agrair que hagi estat l'eix vertebrador d'aquesta tesi. Poques vegades coincideixen tantes qualitats excepcionals en una sola persona, que fan que avui en dia sigui per a molts un referent com a metge, com a científic, com a mestre i com a company. Em sento molt afortunada per haver pogut comptar amb tu en tot moment, el deute és immens, el record inesborrable.

M'agradaria també fer un agraïment especial a les figures del Professor Elías Campo, el Professor Emili Montserrat i el Professor Ciril Rozman. Tots ells han estat responsables de la creació i direcció de multitud de projectes, i la casualitat ha fet que hagin coincidit en aquest, on hi han deixat empremtes diferents però inestimables.

Finalment, vull fer un darrer reconeixement, no per això menys important ni menys sentit, a tots els mestres, i després companys, que han contribuït a la meva formació com a hematòloga, i a tots els companys, que en algun moment m'han fet de mestres. Gràcies pel dia a dia, per haver estat a prop durant aquest procés i per les petites grans anècdotes que m'han fet créixer com a professional i com a persona. No tinc cap mena de dubte que aquesta tesi també conté molt de vosaltres.

Eva Giné Soca  
Barcelona, abril 2010

# Sumari

<b>I. INTRODUCCIÓ</b> .....	11
<b>1. CLASSIFICACIÓ HISTOLÒGICA DELS LIMFOMES NO HODGKINIANS</b> .....	13
1.1. Classificació de la OMS.....	13
1.2. Limfoma fol·licular.....	17
1.2.1. Generalitats del limfoma fol·licular .....	17
1.2.2. El gangli limfàtic al limfoma fol·licular .....	21
1.3. Leucèmia limfàtica crònica .....	23
1.3.1. Generalitats de la leucèmia limfàtica crònica.....	23
1.3.2. El gangli limfàtic a la leucèmia limfàtica crònica.....	29
<b>2. TRANSFORMACIÓ HISTOLÒGICA EN EL LIMFOMA FOL-LICULAR</b> .....	32
2.1. Perspectiva històrica.....	32
2.2. Histologia .....	33
2.3. Biologia .....	34
2.3.1. Mecanismes Genètics.....	35
2.3.2. Microambient.....	38
2.4. Clínica .....	39
2.5. Tractament.....	42
<b>3. TRANSFORMACIÓ HISTOLÒGICA EN LA LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA</b> .....	44
3.1. Perspectiva històrica.....	44
3.2. Histologia .....	45
3.3. Biologia .....	47
3.4. Clínica .....	51
3.5. Tractament.....	54

<b>II. HIPÒTESIS I OBJECTIUS</b> .....	57
HIPÒTESIS DE TREBALL .....	59
OBJECTIUS .....	61
<b>III. RESULTATS</b> .....	63
PRIMER TREBALL.....	65
SEGON TREBALL.....	75
<b>IV. DISCUSSIÓ</b> .....	105
<b>V. CONCLUSIONS</b> .....	119
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b> .....	123

## Abreviatures

**AID:** activation-induced cytidine deaminase  
**aUPD:** acquired uniparenteral disomy  
**BCR:** B cell receptor  
**CGH:** comparative genomic hybridization  
**CP:** centres de proliferació  
**FLIPI:** The Follicular Lymphoma International Index  
**Ga-67 SPECT:** Gallium 67 single-photon emission computed tomography  
**HHV8:** human herpes virus-8  
**HMS:** hipermutació somàtica  
**Hpf:** high-power field  
**IPI:** The International Prognostic Index  
**LDCG:** limfoma difús de cèl·lules grans  
**LDH:** lactat deshidrogenasa  
**LF:** limfoma fol·licular  
**LH:** limfoma de Hodgkin  
**LNH:** limfoma no Hodgkin  
**MALT:** mucosa-associated lymphoid tissue  
**NOS:** not otherwise specified  
**RCC:** recombinació de classe de cadena pesada  
**LLC:** leucèmia limfàtica crònica/ limfoma limfocític de cèl·lula petita  
**IGVH:** segment VH del domini variable de la cadena pesada de les immunoglobulines  
**FDG-PET:** fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography scan  
**FISH:** fluorescence in situ hybridization  
**SNC:** sistema nerviós central  
**SNP:** single nucleotide polymorphism  
**SR:** síndrome de Richter  
**VEB:** virus Epstein-Barr



## I. INTRODUCCIÓ



# 1. Classificació histològica dels limfomes no hodgkinians

## 1.1. Classificació de la OMS

La classificació dels limfomes no hodgkinians (LNH) ha evolucionat al llarg del temps per tal d'integrar els nous coneixements que aportava la recerca en aquest camp. En les primeres classificacions es van considerar tan sols aspectes purament morfològics,<sup>1</sup> per més endavant introduir l'origen limfoide B o T del tumor<sup>2,3</sup> i també aspectes pronòstics. De fet als anys 80 existien simultàniament no menys de 6 classificacions i en aquell moment la Working Formulation (The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project, 1982)<sup>4</sup> es va elaborar com una mena de diccionari entre elles. Afortunadament, als anys 90 es va realitzar una integració de tota la informació disponible, incloent la clínica, la morfologia, l'immunofenotip, la genètica i les dades moleculars amb l'objectiu de reconèixer entitats nosològiques concretes. Aquesta darrera proposta quedà traduïda inicialment en una primera classificació del *International Lymphoma Study Group* (la *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms* o classificació REAL)<sup>5</sup> i finalment en la classificació dels tumors del teixit limfoide de la Organització Mundial de la Salut (OMS)<sup>6</sup> de la que s'ha fet una primera revisió que és la vigent a l'actualitat.<sup>7</sup>

Les classificacions actuals de les neoplàsies limfoides B es basen en les semblances de la cèl·lula tumoral amb els estadis de diferenciació de la cèl·lula B normal ja que en la majoria de casos la cèl·lula tumoral tendeix a mimetitzar els estadis de maduració del seu precursor normal. No obstant no sempre pot assignar-se un precursor normal i en alguns casos pot existir heterogeneïtat de línia i fins i tot plasticitat lineal.<sup>8,9</sup> En aquestes classificacions es reconeix l'existència d'unes entitats amb un comportament clínic indolent i d'altres de caràcter agressiu. Un aspecte rellevant de les

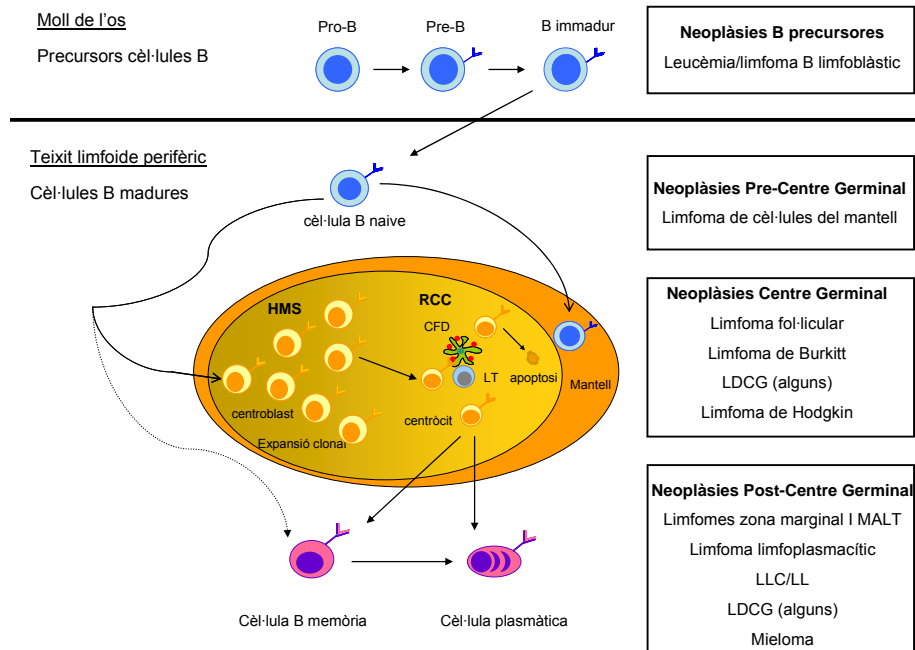


neoplàsies limfoides indolents és que poden evolucionar cap a formes agressives, en un procés denominat transformació o progressió histològica. Aquest fenomen és especialment ben conegut tant en la leucèmia limfàtica crònica (LLC)<sup>10</sup> com en el limfoma fol·licular (LF),<sup>11</sup> tot i haver estat descrit en la gran majoria de les síndromes limfoproliferatives indolents, incloent el limfoma limfoplasmocitoide o macroglobulinèmia de Waldenström, el limfoma esplènic de la zona marginal i els limfomes extranodals de la zona marginal del teixit limfoide associat a mucoses o limfomes MALT.<sup>7</sup>

**Classificació de les neoplàsies de línia B (World Health Organization Classification of Tumours, 2008):**

- ❖ Neoplàsies de precursors limfoides B
  - Leucèmia/Linfoma limfoblàstic B, NOS
  - Leucèmia/Linfoma limfoblàstic B amb alteracions genètiques recurrents
- ❖ Neoplàsies de cèl·lules B madures
  - Leucèmia limfàtica crònica/limfoma limfocític de cèl·lula petita
  - Leucèmia prolimfocítica de cèl·lules B
  - Limfoma de cèl·lules B de la zona marginal esplènica
  - Tricoleucèmia
  - Leucèmia/limfoma esplènic, no classificable
  - Limfoma limfoplasmacític
  - Malaltia de les cadenes pesades de les immunoglobulines
  - Mieloma de cèl·lules plasmàtiques/ Plasmocitoma
  - Limfoma de cèl·lules B extraganglionar de la zona marginal del teixit limfoide associat a mucosa (MALT)
  - Limfoma de cèl·lules B ganglionar de la zona marginal
  - Limfoma fol·licular
  - Limfoma primari cutani de centre fol·licular
  - Limfoma de cèl·lules del mantell
  - Limfoma difús de cèl·lules grans B, no especificat (LDCG)
  - Limfoma de cèl·lules grans B ric en cèl·lula T i histiòcits
  - Limfoma primari de cèl·lules grans B del sistema nerviós central (SNC)

- Limfoma primari cutani de cèl·lules grans B de tipus extremitats inferiors
- Limfoma difús de cèl·lules grans B, EBV positiu de la gent gran
- Limfoma difús de cèl·lules grans B associat a inflamació crònica
- Granulomatosi limfomatoide
- Limfoma difús de cèl·lules grans B primari del mediastí (tímic)
- Limfoma difús de cèl·lules grans B intravascular
- Limfoma difús de cèl·lules grans B ALK positiu
- Limfoma plasmablàstic
- Limfoma difús de cèl·lules grans B originat en una malaltia de Castleman multicèntrica associada a HHV8
- Limfoma primari de cavitats
- Limfoma de Burkitt
- Limfoma de cèl·lules B, inclassificable, amb trets intermedis entre un LDCG i un limfoma de Burkitt
- Limfoma de cèl·lula B, inclassificable, amb trets intermedis entre un LDCG i un limfoma de Hodgkin clàssic



**Figura 1.** Esquema de la diferenciació de la cèl·lula B i de la relació dels diferents estadis madurats amb les principals neoplàsies limfoides B. Les cèl·lules precursors B que completen correctament la maduració inicial al moll de l'os es converteixen en cèl·lules B madures sense experiència antigènica. Un cop contacten amb l'antígen i es transformen en blastes poden convertir-se en cèl·lules plasmàtiques amb una vida curta o bé inicien la reacció del centre germinal on es produeix la hipermutació somàtica de les immunoglobulines (HMS) i la recombinació de canvi de classe de cadena pesada (RCC). Al final de la reacció es produeixen limfòcits B memòria i cèl·lules plasmàtiques amb BCRs d'una alta afinitat per l'antígen.

## 1.2. Limfoma fol·licular

### 1.2.1. Generalitats del limfoma fol·licular

El limfoma fol·licular (LF) és el subtipus histològic més comú dins els limfomes indolents, i suposa el 20% dels diagnòstics del conjunt de limfomes, presentant una major incidència als Estats Units i l'Europa Occidental.<sup>12</sup> Es diagnostica habitualment en adults amb una mitjana d'edat de 60 anys, tot i que s'ha reconegut una forma pediàtrica. Altres variants descrites en la vigent classificació de la OMS inclouen el LF intestinal primari, altres LF extranodals i el LF "in situ".

El LF es caracteritza des d'un punt de vista histològic per un patró de creixement fol·licular que recorda el dels centres germinals normals i des d'un punt de vista molecular per l'existència de la translocació t(14;18)(q32;q21) que s'objectiva fins en un 90% dels casos mitjançant la tècnica de *FISH*.<sup>13</sup> Aquesta translocació es considera l'esdeveniment genètic inicial en l'origen del LF, essent la causa de la sobreexpressió de la proteïna antiapoptòtica BCL2 que confereix un avantatge de supervivència a la cèl·lula. En aquest procés de limfomagènesi, a banda de l'adquisició de la t(14;18) es requereix l'aparició d'altres alteracions genètiques secundàries que contribuiran a la desregulació del control del cicle cel·lular i l'apoptosi, fets necessaris per al desenvolupament, la progressió i la transformació del LF. Les alteracions genètiques que s'associen més freqüentment inclouen la pèrdua de 1p, 6q, 10q i 17p i guanys en els cromosomes 1, 6p, 7, 8, 12q, X i (der)18.<sup>14-16</sup>

El LF es diagnostica típicament en estadis avançats, arran l'aparició d'adenopaties no doloroses a territoris perifèrics de mesos o anys d'evolució, i fins en un 60% dels pacients s'objectiva infiltració a nivell de la

medul·la òssia. Tan sols un 20% dels pacients es diagnostica en un estadi clínic localitzat. Tot i això, el LF es caracteritza per presentar un curs clínic típicament indolent, caracteritzat per recidives contínues amb un interval de temps cada cop més curt entre la necessitat d'un nou tractament.<sup>17</sup> La supervivència mitjana dels pacients es troba al voltant dels 10 anys, i probablement a l'actualitat més propera als 15 anys, no obstant, es considera que el comportament clínic dels pacients pot ser marcadament heterogeni, d'aquí que s'hagin fet esforços per tal d'identificar diferents categories pronòstiques. La utilització de l'índex pronòstic IPI (*The International Prognostic Index*), originalment descrit per al limfoma difús de cèl·lules grans (LDCG), s'ha demostrat útil amb la seva aplicació retrospectiva en pacients amb LF tant en termes de supervivència lliure de progressió com de supervivència.<sup>18</sup> Des de l'any 2004 es disposa d'un índex pronòstic dissenyat específicament per al LF, el FLIPI (*The Follicular Lymphoma International Index*),<sup>19</sup> que identifica tres categories pronòstiques diferents cadascuna d'elles suposant una tercera part dels pacients aproximadament (Taula 1).

**Taula 1.** Pronòstic dels pacients amb LF segons el grup de risc definit per l'índex FLIPI

Variables	Grup de Risc	N. Factors	SG als 5 anys (%)	SG als 10 anys (%)
Edat ≥60 anys	<b>Baix</b>	0-1	91%	71%
Estadi Ann-Arbor III-IV				
Hemoglobina <120 g/L				
LDH elevada	<b>Intermig</b>	2	78%	51%
N. territoris ganglionars >4				
	<b>Alt</b>	≥3	53%	36%

A banda d'aquests índex pronòstics que fonamentalment reflecteixen el grau d'extensió del tumor, el grau 3 histològic (veure el proper subapartat) i la proliferació tumoral poden discriminar casos amb un comportament clínic més agressiu. Des d'un punt de vista biològic, però de moment encara sense una aplicabilitat clínica, la troballa d'algunes alteracions genètiques com la del6q23-26, del17p, -1p, +12, +18p, +Xp, els cariotips complexos, la t(8;14) associada, les mutacions de TP53 i determinats perfils d'expressió gènica que depenen del microambient associat al tumor correlacionen amb un pronòstic desfavorable.<sup>14,16,20-22</sup>

L'estratègia terapèutica en el LF és extremadament heterogènia tant pel que fa a les indicacions com en el tipus de tractament que s'aplica. De forma general els estadis clínics localitzats, que suposen menys del 15-20% de casos, es beneficien d'un tractament immediat basat en la radioteràpia que aconsegueix unes altes taxes de resposta i de remissions lliures de malaltia, en alguns casos fins i tot la curació.<sup>23,24</sup>

Per a la resta de pacients en estadis avançats, incurables amb les estratègies actuals, no està demostrat que iniciar tractament de forma immediata suposi un benefici ni en termes de supervivència ni en el patró de recidives i per tant en absència de criteris d'activitat com els reflectits a la Taula 2 pot diferir-se el tractament fins a l'aparició de simptomatologia per progressió del limfoma.<sup>25</sup>

**Taula 2.** Criteris de tractament per al LF

Criteris de tractament del Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires (GELF)
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Massa ganglionar o extraganglionar (excepte melsa) de més de 7 cm en el diàmetre major</li><li>▪ Síntomes B</li><li>▪ Elevació de LDH o <math>\beta</math>2-microglobulina sèriques</li><li>▪ Afectació de com a mínim 3 territoris ganglionars (cadascun amb un diàmetre major a 3 cm)</li><li>▪ Esplenomegàlia</li><li>▪ Síndrome compressiva</li><li>▪ Vessament pleural o peritoneal</li><li>▪ Insuficiència medul·lar secundària a infiltració per limfoma</li></ul>

La immunoteràpia (anti-CD20) associada a diferents combinacions de règims quimioteràpics s'ha establert com la base terapèutica tant en primera com en ulteriors línies de tractament, en tant que també s'està explorant el paper de la immunoteràpia com a tractament de manteniment. L'impacte que aquests nous tractaments tindran sobre la supervivència del LF - que per primer cop en les darreres dècades podrien suposar un increment de la supervivència global<sup>26-28</sup> i els possibles canvis en les indicacions de tractament que se'n derivin són motiu d'estudi en diferents assaigs clínics.

L'aparició de resistència als tractaments o la transformació a un subtipus histològic d'alt grau són esdeveniments finals en el curs clínic evolutiu de la malaltia. Nogensmenys, la transformació pot aparèixer de forma més precoç i donat el seu impacte pronòstic marcadament desfavorable té una gran rellevància el fet de poder-la diagnosticar. En aquest sentit, la indicació de

biòpsia ganglionar en les subsegüents recaigudes del LF es recomana sempre que sigui possible per tal de descartar la progressió histològica i especialment la transformació a un limfoma d'alt grau, fets que condicionarien des d'un punt de vista clínic el tractament de rescat a aplicar.

### 1.2.2. El gangli limfàtic al limfoma fol·licular

La majoria de casos de LF presenten a l'examen morfològic un típic patró fol·licular, com a mínim parcial, que esborra l'arquitectura normal del gangli limfàtic. Poden coexistir patrons fol·liculars i difusos i també patrons predominantment difusos, tot i que es considera que l'absència de fol·licles sol correspondre a biòpsies de mida petita i per tant artefactades per aquest fet.

Les cèl·lules tumorals, centròcits i centroblastes que són les cèl·lules que de forma normal s'observen en els centre germinals no tumorals, presenten positivitat per immunoglobulines de superfície i antígens de línia B (CD19, CD20, CD22 i CD79a) a més de BCL2, BCL6 i CD10. Característicament la proteïna BCL2 s'expressa de forma uniforme en els fol·licles tumorals i aquest fet permet una ràpida discriminació respecte els fol·licles limfoides normals residuals. A més dins aquests fol·licles neoplàsics també s'observen xarxes de cèl·lules fol·liculars dendrítiques identificables per la positivitat dels marcadors CD21 i CD23, entre altres cèl·lules no tumorals com diferents subtipus de cèl·lules T i histiòcits.

Clàssicament s'han distingit diferents graus histològics en el LF, 1 a 3, d'acord amb la proporció de cèl·lules grans o centroblastes presents en el tall histològic (Taula 3).<sup>12,29</sup> Tot i la difícil reproduïbilitat d'aquest mètode de gradació histològica<sup>30</sup> els estudis clínics han demostrat que els LF amb un major contingut de cèl·lules grans presenten un curs clínic més desfavorable



en termes de supervivència i de transformació histològica.<sup>31-33</sup> Aquest fet és clínicament rellevant pel que fa al grau 3 histològic, que representa entre el 10 i 20% dels LF, on està ben establert que per tal de revertir l'impacte pronòstic negatiu sobre la supervivència cal tractar els pacients amb un règim de quimioteràpia equivalent als esquemes que s'indiquen en els limfomes difusos de cèl·lula gran B (LDCG).<sup>31-35</sup>

**Taula 3.** Gradació histològica del LF

Gradació	Definició
<b>Graus 1-2</b>	0-15 centroblastes per hpf*
<b>1</b>	0-5 centroblastes per hpf
<b>2</b>	6-15 centroblastes per hpf
<b>Grau 3</b>	>15 centroblastes per hpf*
<b>3A</b>	Presència de centròcits
<b>3B</b>	Làmines de centroblastes
Davant la presència d'una àrea difusa constituïda per > 15 centroblastes per hpf independentment de la seva mida cal fer el diagnòstic de LDCG amb LF	

\* hpf de 0,159 mm<sup>2</sup> (objectiu 40x, camp ocular 18mm), mitjana de 10 hpf en 10 fol·licles representatius

Taula adaptada de la classificació de la OMS 2008

L'índex proliferatiu normalment incrementa de forma paral·lela al grau histològic, no obstant existeixen excepcions en aquesta observació que poden influenciar el comportament clínic del tumor.<sup>36</sup>

En els darrers anys s'han acumulat evidències en relació a la existència d'importants diferències biològiques entre els graus 3A i 3B. Aquests darrers constituïrien tan sols un 20% dels grau 3 i presentarien característiques més properes als LDCG com presència d'alteracions a nivell de 3q27 i reordenament de BCL6, essent la t(14;18) molt infreqüent.<sup>37-40</sup> De fet, des d'un punt de vista histològic es poden identificar àrees de LDCG en el 60-

80% dels casos classificats com LF grau 3B, que en base a la revisió actual de la classificació de la OMS caldria diagnosticar-los com LDCG amb LF.<sup>39,41</sup>

El conjunt d'aquestes dades fa replantejar-se el sistema de gradació histològica en el LF, no obstant tot i la controvèrsia que existeix donat que de moment no es disposa de prou evidències per proposar una alternativa concreta, l'actual classificació de la OMS ha decidit mantenir-la.

## 1.3. Leucèmia limfàtica crònica

### 1.3.1. Generalitats de la leucèmia limfàtica crònica

La leucèmia limfàtica crònica (LLC) és el tipus més freqüent de síndrome limfoproliferativa crònica en adults del món Occidental, amb una incidència que es troba entre 2-6 casos/ 100.000 persones/any, assolint el pic màxim als 65 anys d'edat. A més la leucèmia limfàtica crònica/limfoma limfocític de cèl·lula petita ben diferenciada (LLC/LL) suposa al voltant del 10% dels diagnòstics de LNH efectuats en les biòpsies ganglionars.<sup>42</sup>

La LLC es caracteritza per una infiltració per limfòcits B monoclonals CD5+ del moll d'os, la sang perifèrica i els teixits limfoides. L'examen morfològic de la sang perifèrica junt a l'immunofenotipatge de les cèl·lules tumorals sol ser suficient per tal d'establir el diagnòstic.<sup>43</sup> La biòpsia ganglionar es reserva per determinades situacions clíniques com ara les dificultats diagnòstiques amb els mètodes abans esmentats, en el cas d'absència d'expressió leucèmica i sempre que hi hagi sospita clínica de transformació histològica per tal d'obtenir un diagnòstic de confirmació o d'exclusió.<sup>43</sup>

A diferència d'altres síndromes limfoproliferatives aquest tumor no té cap alteració genètica específica. Ara bé, la presència de determinades alteracions citogenètiques detectades per FISH com la deleció de 17p13 o

de 11q22-23 causants de la pèrdua dels gens supressors de tumors *p53* i *atm* respectivament, han demostrat tenir un impacte pronòstic negatiu en la supervivència dels pacients.<sup>44</sup> L'alteració genètica més freqüent, que a més correlaciona amb un pronòstic favorable, és la deleció de 13q14. Aquesta alteració condueix a la pèrdua dels microRNA (*miRNA*) *miR-15a* i *miR-16-1*, que regulen de forma post-transcripcional el gen *bcl-2*.<sup>45</sup> La hipòtesi actual és que en la LLC les alteracions genètiques conduïrien a una desregulació de miRNA específics involucrats en el control transcripcional/post-transcripcional de diferents gens.<sup>45,46</sup>

Des d'un punt de vista biològic hi ha hagut avenços molt importants en els darrers deu anys, molts d'ells relacionats amb el funcionalisme del receptor de la cèl·lula B (BCR). S'han descrit dos subtipus biològics de LLC en funció de l'estat mutacional del segment V<sub>H</sub> del domini variable de la cadena pesada de les immunoglobulines (a partir d'ara referit com estat mutacional del IGVH o estat mutacional de les immunoglobulines). Cadascun d'aquests subtipus suposa aproximadament el 50% dels casos de LLC. Els pacients amb un baix nombre de mutacions del gen IGVH (>98% d'homologia amb la línia germinal) presenten un pronòstic en termes de temps a la progressió i supervivència més desfavorable que aquells pacients amb hipermutacions a IGVH.<sup>47,48</sup> A més, els pacients no mutats presenten característiques biològiques diferencials respecte els casos mutats: més freqüència d'alteracions genètiques de mal pronòstic, longitud de telòmers més curta o marcadors sèrics desfavorables. Per altra banda, l'ús d'un repertori de gens molt restrictiu i esbiaixat per al IGVH de les cèl·lules de LLC, junt amb la presència d'estereotips a nivell del segment CDR3 en un 40% dels casos no mutats respecte a un 10% dels casos mutats, fa pensar que l'exposició antigènica podria estar involucrada en la patogènesi d'aquest tumor. Aquest fet té traducció clínica en alguns pacients, ja que els casos amb un IGVH3-

21 que presenten un CDR3 estereotipat tenen un curs clínic desfavorable de forma independent al seu estat mutacional.<sup>49,50</sup>

Els estudis d'expressió gènica han demostrat que el perfil d'expressió de la LLC és únic i distintiu respecte altres tumors. Aquest fet ha derivat en el concepte de que, malgrat hi ha dos subtipus biològics en funció de l'estat mutacional de les immunoglobulines, caldria considerar a la LLC com a una única malaltia.<sup>51</sup> Les comparacions dels perfils d'expressió gènica de la LLC amb els de diferents subpoblacions de limfòcits B normals també ha permès establir que la subpoblació que més s'hi assembla, de forma independent a l'estat mutacional IGVH, és la dels limfòcits B memòria. A més, aquests estudis han permès identificar gens com el de la tyrosina kinasa ZAP-70, que s'expressa de forma diferencial en funció de l'estat mutacional del IGVH. Aquells pacients amb expressió elevada de ZAP-70 no solen tenir mutacions de IGVH, mentre que els pacients amb expressió baixa de ZAP-70 solen presentar hipermutacions de IGVH. La determinació de l'expressió de la proteïna ZAP-70 mitjançant la citometria de fluxe ha permès posar a l'abast dels clínics de forma rutinària una eina per determinar el pronòstic dels pacients amb LLC.<sup>52</sup>

Des d'un punt de vista clínic la LLC es comporta de forma molt heterogènia, amb formes clíniques molt indolents que no arriben a requerir tractament fins a formes agressives amb una curta supervivència tot i els tractaments instaurats. Els estadis clínics de Rai i Binet, basats en una simple exploració física i en les dades bàsiques de l'hemograma, han permès definir l'extensió de la malaltia i el seu pronòstic i, de fet, continuen vigents a l'actualitat.<sup>43,53</sup> Nogensmenys, els estadis clínics no permeten predir aquells pacients en estadi inicial que tenen una alta probabilitat de progressar i requerir tractament. Per aquest motiu en els darrers anys s'han identificat nombrosos factors pronòstics que permeten refinar el pronòstic particularment en els

estadis clínics inicials de la malaltia (Taula 4). Aquest fet és especialment rellevant ja que a l'actualitat més del 80% dels pacients amb LLC es diagnostiquen en estadis clínics inicials. Les implicacions en el maneig clínic i terapèutic que aquests factors pronòstics puguin tenir encara estan sota discussió.

**Taula 4.** Resum dels principals factors pronòstics en la leucèmia limfàtica crònica

	Baix Risc (SG >15 anys)	Alt Risc (SG <7 anys)
Estadi clínic de Binet	A	B,C
Estadi clínic de Rai	0,I	II-IV
Recompte limfocitari	baix	alt
Patró d'infiltració medular	nodular, intersticial	difús
Morfologia limfocitària	típica	atípica
Temps de duplicació limfocitària	> 12 mesos	< 12 mesos
Marcadors sèrics*	normals	elevats
Alteracions genètiques	del13q	+12, del17p, del11q
Estat mutacional IGVH	mutat	no mutat
IGVH 3-21	absent	present
ZAP-70	<20%	≥20%
CD38	<30%	≥30%
CD49d	<45%	≥45%

\* β2-microglobulina, LDH, timidina kinasa i CD23s

L'estratègia terapèutica en aquesta malaltia ha patit una modificació profunda en les darreres dues dècades, passant de la pal·liació de símptomes com a únic objectiu factible amb el tractament amb agents alquilants, a la obtenció del màxim grau de resposta possible amb les combinacions terapèutiques actuals, que ha demostrat associar-se amb una millor supervivència.<sup>54-58</sup> Aquest canvi ha estat afavorit per la introducció de nous fàrmacs, fonamentalment els anàlegs de les purines, que han permès

augmentar de forma important la taxa de respostes en la LLC en comparació als agents alquilants. A l'actualitat de forma similar al que té lloc en altres síndromes limfoproliferatives les combinacions d'immunoquimioteràpia, associant l'anti-CD20 a esquemes basats en anàlegs de purines, s'estan convertint en el tractament d'elecció en primera línia, assolint altes taxes de resposta (superiors al 90%) que es mantenen en el temps en una bona proporció dels casos (68% dels pacients als 5 anys),<sup>57</sup> així com en el tractament de les recidives.<sup>59</sup> La presència d'una deleció 17p és un dels factors que més clarament s'ha demostrat implicat en la resistència a tractaments convencionals o amb anàlegs de purines,<sup>60-62</sup> de forma que en aquestes situacions es recomana incloure als pacients en assajos clínics específics amb fàrmacs com l'alemtuzumab<sup>63</sup> o fins i tot considerar un trasplantament al·logènic de progenitors hemopoètics de forma més precoç.<sup>43</sup>

Malgrat els avenços terapèutics realitzats els darrers anys aquesta malaltia continua considerant-se incurable amb les estratègies disponibles a l'actualitat i per tant en general fora d'assajos clínics la decisió d'iniciar tractament ve guiada per l'estadi clínic i per l'aparició de criteris d'activitat de la malaltia (Taula 5).

**Taula 5.** Resum dels criteris clínics utilitzats per indicar tractament en la LLC

Criteris d'activitat en la Leucèmia Limfàtica Crònica
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Insuficiència medul·lar que es manifesta amb l'aparició o intensificació d'anèmia i/o trombopènia</li><li>▪ Esplenomegàlia massiva (e.g. &gt; 6 cm per sota la vora costal esquerra) o progressiva</li><li>▪ Masses adenopàtiques (e.g. &gt; 10 cm en el diàmetre major) o progressives</li><li>▪ Limfocitosi progressiva amb un increment superior al 50% en un període de 2 mesos o bé un TDL inferior a 6 mesos</li><li>▪ Anèmia i/o trombopènia autoimmunes amb una escassa resposta al tractament amb esteroïdes</li><li>▪ Presència de com a mínim un dels següents símptomes relacionats amb la malaltia:<ul style="list-style-type: none"><li>A) Pèrdua de pes <math>\geq</math> 10% inintencionada en els 6 mesos precedents</li><li>B) Fatiga intensa (e.g. ECOG <math>\geq</math> 2)</li><li>C) Febre <math>&gt;38^{\circ}\text{C}</math> durant dues o més setmanes sense evidència d'infecció</li><li>D) Sudoració vespertina sense evidència d'infecció</li></ul></li></ul>

En relació a la història natural de la LLC hi ha dos aspectes interessants. El primer d'ells és la recent descripció d'una nova categoria diagnòstica, la limfocitosi B monoclonal<sup>64</sup> que consisteix en la detecció de cèl·lules circulants amb un immunofenotip i unes característiques biològiques similars a la LLC en subjectes aparentment sans però que no assoleixen els criteris diagnòstics de LLC. El risc de progressió a una LLC establerta està estimat al voltant d'un 1,1% anual, tot i que seran necessaris més estudis per entendre la significació real d'aquesta troballa donada la seva alta freqüència (3,5% de la població de més de 65 anys). L'altre aspecte interessant és la probabilitat de transformació histològica. De forma similar al que té lloc en altres síndromes limfoproliferatives de baix grau, la transformació histològica a un limfoma d'alt grau és un esdeveniment ben conegut en la LLC. L'impacte pronòstic d'aquest fet és extremadament

desfavorable i condiona supervivències inferiors a l'any en la majoria dels pacients.

### 1.3.2. El gangli limfàtic a la leucèmia limfàtica crònica

El gangli limfàtic a la LLC mostra una arquitectura ganglionar completament esborrada per un patró pseudofol·licular constituït per àrees més pàl·lides anomenades centres de proliferació, on s'identifiquen cèl·lules de major tamany tipus prolimfòcit o paraimmunoblast, envoltades d'àrees més fosques constituïdes per limfòcits de mida petita. L'activitat mitòtica habitualment és molt baixa.<sup>7</sup>

La histologia de la LLC en el gangli limfàtic ha estat motiu d'estudi principalment en sèries publicades fa anys. Les troballes histològiques són heterogènies tant en termes del nombre i la mida dels centres de proliferació com en el contingut de cèl·lules grans. No obstant, cap d'aquestes característiques histològiques s'ha pogut correlacionar de forma concloent amb un pronòstic diferent.<sup>65-71</sup>

Caldria destacar que en les descripcions que Lennert feu l'any 1978<sup>69</sup> i l'any 1990<sup>72</sup> es reconeixien tres patrons histològics en la LLC d'acord amb el nombre de prolimfòcits i paraimmunoblastes presents en el tall histològic. El patró difús caracteritzat per la presència d'escassos prolimfòcits i paraimmunoblasts tan sols identificables a gran augment i que suposaria el 7% dels casos aproximadament. El pseudofol·licular que resultava de la formació d'agregats d'aquestes cèl·lules grans era el patró majoritari i suposava un 85% de casos. El tercer patró objectivat en un 8% dels casos l'anomenà "tumor-forming" i s'hi observava un excés de proliferació de prolimfòcits caracteritzant-se a l'examen microscòpic per la presència d'extenses àrees més pàl·lides. Aquest autor hipotetitzà que aquests darrers



casos probablement presentaven un curs clínic més desfavorable comparat als casos amb una histologia difusa o amb petits pseudofol·licles. No obstant, aquesta hipòtesi no va ser ulteriorment avaluada en cap estudi clínic.

Posteriorment un nombre limitat d'estudis han provat de correlacionar les característiques histològiques del gangli limfàtic amb un pronòstic diferent dels pacients. D'entre els estudis que han abordat aquesta qüestió caldria esmentar la publicació de Ben-Ezra<sup>66</sup> l'any 1989, que es correspon a la sèrie publicada amb més casos analitzats, on es demostrà en 268 casos de limfoma limfocític que el contingut de cèl·lules grans presents en el tall histològic era una variable pronòstica independent pel que feia a la supervivència, especialment en aquells casos amb leucocitosi. Aquesta mateixa sèrie però, no va poder trobar diferències pel que feia a la supervivència entre els casos amb un patró infiltratiu difús (60% dels casos) i un patró pseudofol·licular (40% dels casos). La principal crítica a aquest estudi és la manca de criteris fenotípics en la selecció dels casos de LLC i per tant que altres malalties diferents a la LLC hi estiguessin incloses. Sota aquesta mateixa limitació, s'han d'emmarcar d'una banda el treball previ de Dick<sup>68</sup> de l'any 1978, on en 41 casos analitzats no s'havia pogut objectivar que la presència d'un cert grau d'immaduresa en els ganglis limfàtics impliqués una marcada reducció de la supervivència dels pacients, i d'altra banda, el treball de Morrison i cols.<sup>70</sup> que observà un millor pronòstic dels pacients amb un patró nodular que amb un patró difús.

Els estudis més recents que sí inclouen criteris immunofenotípics, també estan fortament limitats pel nombre de pacients o pel seguiment clínic, la qual cosa fa també que sigui impossible establir conclusions fermes sobre la significació pronòstica de la histologia del gangli limfàtic en la LLC.<sup>65,67,71</sup> Swerdlow i cols.<sup>71</sup> analitzaren l'impacte que tenia en la supervivència la

major ocupació del gangli per centres de proliferació sense arribar a demostrar cap diferència estadísticament significativa. La sèrie de Bonato<sup>67</sup> descriví una correlació entre la presència de CP prominents i el diagnòstic morfològic d'una LLC atípica, tot suggerint que aquest darrer fet podria explicar indirectament un pronòstic desfavorable dels pacients.<sup>73</sup> No obstant, no pogué demostrar diferències en la supervivència entre pacients amb i sense CP prominents. En contraposició, la sèrie d'Asplund i cols.<sup>65</sup> no trobà correlació entre la presència d'uns CP prominents, els marcadors immunofenotípics a sang perifèrica i les característiques clíniques, tot i que no es podien establir conclusions en quant al pronòstic dels pacients pel limitat nombre i seguiment dels pacients.

En conjunt tots aquests estudis presenten unes importants limitacions que fan que no hagi estat possible fins al moment actual establir unes conclusions definitives pel que fa a la relació entre les troballes histològiques a nivell ganglionar i un impacte pronòstic clínic. Probablement aquest fet ha contribuït a que s'hagi considerat que la biòpsia ganglionar afegeix en termes generals poca informació rellevant en la LLC. La única excepció en aquest escenari seria la troballa a nivell ganglionar o extraganglionar d'una transformació histològica a un LDCG (síndrome de Richter) que s'associaria a un impacte pronòstic molt desfavorable.

## 2. Transformació histològica en el limfoma fol·licular

### 2.1. Perspectiva històrica

L'observació que els pacients amb limfoma fol·licular (LF) poden presentar durant l'evolució de la malaltia trets histològics d'alt grau -amb la substitució del patró típic histològic fol·licular per un de difús constituït predominantment per cèl·lules grans- és un fet ben conegut en la història natural del LF. Les primeres descripcions d'aquest fenomen daten de l'any 1942 amb les observacions de Gall i Mallory<sup>74</sup> i de l'any 1956 quan Rappaport<sup>11</sup> estableix una correlació clínica amb el patró histològic del LF a partir de l'estudi de 253 casos. En aquest treball descriu com l'arquitectura nodular s'associaria a un millor pronòstic en comparació amb els patrons difusos. Des d'aleshores, diferents grups d'investigadors han analitzat els aspectes diagnòstics, pronòstics i terapèutics de la transformació histològica en el LF.<sup>75-86</sup> La influència negativa de la transformació histològica en el curs dels pacients amb LF quedà ben establerta l'any 1982, quan Hubbard i cols. del *National Cancer Institute* a l'estudiar les implicacions clíniques del canvi histològic en una àmplia sèrie de LF, observaren que la supervivència dels pacients que evolucionaven a un LDCG es trobava significativament disminuïda respecte a la d'aquells en els que la histopatologia de la rebiòpsia continuava mostrant un patró de creixement nodular.<sup>81</sup>

Un dels principals problemes que freqüentment dificulten la comparació entre els diferents estudis és la manca d'homogeneïtat en la definició de la transformació histològica, que es basa en les classificacions histològiques vigents en cada època (Rappaport, Working Formulation, Revised European-American Lymphoma (REAL) o la de la Organització Mundial de la Salut). En aquest sentit, històricament alguns autors van considerar casos de LF transformats en base a l'aparició d'un patró difús, independentment

del tipus cel·lular proliferant, o alternativament en base a la progressió en el grau histològic (aparició d'un grau 3). Aquestes dues situacions queden excloses de la consideració de transformació histològica en la classificació de la OMS vigent a l'actualitat.<sup>7</sup> En aquesta classificació es contempla la transformació histològica davant la presència d'una àrea de LDCG de forma independent a la seva mida, en per la resta, un patró histològic de LF.

## 2.2. Histologia

La transformació histològica del LF s'equipara habitualment a l'aparició d'un LDCG-B, que des d'un punt de vista histològic no mostra grans diferències respecte a un LDCG *de novo*. La majoria de casos expressen un fenotip immunohistoquímic de centre germinal amb CD10+ (80%) o bé CD10-, bcl-6+ i MUM1- (9%), en tant que la resta de casos presenten un fenotip indiferenciat. Característicament l'índex proliferatiu mesurat per l'expressió de Ki-67 és molt elevat. Des d'un punt de vista histològic els estudis seqüencials normalment mostren una morfologia molt constant en el LF fins el moment de la transformació histològica.

Els estudis d'expressió gènica mostren també un perfil de centre germinal en tots els casos transformats, tot i que presentarien uns patrons més similars als perfils d'expressió del LF que als dels LDCG *de novo*.<sup>87,88</sup> La pràctica totalitat dels casos de LDCG que apareixen en el context del LF tenen una relació clonal amb el tumor inicial i mantenen el mateix reordenament IgH/BCL-2.<sup>89</sup> A diferència del LF d'origen, on s'objectiva una important variació intraclonal, el LDCG s'origina en una única cèl·lula tumoral del LF i presenta una clona homogènia sense diversificació intraclonal.<sup>89,90</sup> Recentment s'ha demostrat que el mecanisme de transformació resulta en la majoria dels casos (70%) d'una evolució divergent de dues poblacions tumorals, LF i LDCG, que s'originarien en un

precursor comú però també en alguns casos (30%) resultaria d'una transformació directa des d'una subclona més agressiva dins el LF.<sup>91,92</sup>

Esporàdicament s'han descrit evolucions a limfoma de Burkitt i de forma excepcional a limfomes limfoblàstics de fenotipus B que comparteixen en la majoria de casos la relació clonal amb el LF previ.<sup>93-97</sup> En el context de la transformació histològica en el LF poden encabir-s'hi malalties amb una morfologia idèntica a un limfoma de Hodgkin, en els que s'ha demostrat l'existència de la translocació IgH/BCL2 demostrant per tant el seu origen en un progenitor comú.<sup>98</sup> Recentment, també s'han descrit vuit casos amb l'aparició de sarcomes de cèl·lules histiocítiques/dendrítiques en el curs del LF,<sup>99</sup> presentant el mateix origen clonal i essent considerats probablement casos de desdiferenciació/transdiferenciació de cèl·lules B madures. Globalment aquestes associacions no deixen de ser extremadament infreqüents en el context del LF i des del punt de vista clínic de difícil maneig, ara bé el seu interès biològic resulta indiscutible tant en termes d'estudi del procés de limfomagènesi com del dinamisme i plasticitat de la cèl·lula B madura.<sup>100</sup>

### **2.3. Biologia**

Clàssicament s'ha considerat que l'adquisició i l'acumulació de lesions genètiques en les cèl·lules limfoides B són fonamentals tant en el desenvolupament del LF com en la seva transformació. Els avenços en aquest camp de recerca els darrers anys evidencien una major complexitat en aquests processos, on a banda d'un rellevant paper de diferents mecanismes genètics també es perfila una important influència del microambient cel·lular no tumoral i de les interaccions que s'estableixen entre les cèl·lules. En aquest sentit les cèl·lules del LF són cèl·lules

funcionalment actives, també des d'un punt de vista immunològic, i fins i tot es comencen a tenir evidències de la seva plasticitat tumoral.<sup>101,102</sup>

El centre germinal és el lloc ideal per a que es produeixin aquests fenòmens donat que combina ser un dels territoris de l'economia amb major proliferació cel·lular amb la capacitat d'implementar extenses modificacions a l'ADN cel·lular en resposta als antigens -hipermutació somàtica (HMS) i recombinació de classe de cadena pesada (RCC) de les immunoglobulines- i a més és on poden constituir-se múltiples interaccions entre diferents subtipus cel·lulars (cèl·lules B, T, fol·liculars dendrítiques i estromals).

### 2.3.1. Mecanismes Genètics

Els processos de remodelació de l'ADN cel·lular que tenen lloc al centre germinal es consideren les eines que aprofita la cèl·lula B portadora de la t(14;18) per tal de completar la conversió a una cèl·lula tumoral de LF i posteriorment, en alguns casos la transformació a un limfoma d'alt grau. La gran majoria de LF presenten una segona alteració genètica afegida a la t(14;18) i poden observar-se fins a un promig de 6 lesions en estudis citogenètics convencionals. Estudis amb *FISH* i *CGH* afegeixen complexitat a les lesions descrites amb tècniques convencionals. El nombre d'alteracions genètiques augmenta en relació amb el grau histològic del LF i amb la transformació a un limfoma d'alt grau, correlacionant també amb una pitjor supervivència.<sup>14,16,103,104</sup> Els models que descriuen diferents rutes cariotípiques en l'evolució del LF i l'adquisició de les lesions seguint un curs temporal estan encara poc definits, tot i que diferents autors han identificat algunes alteracions que es correlacionen amb un mal pronòstic, especialment -6q i +12, a més de +X, 1p-, +1q, 17p- i 17q- i que poden associar-se a la transformació histològica.<sup>14,16,103,105-108</sup> En alguns casos de transformació a limfomes agressius, incloent limfoma de Burkitt i limfomes

limfoblàstics de cèl·lules B precursors, s'han descrit la t(8;14) i la t(8;22) com a events genètics secundaris adquirits.

Des d'un punt de vista genètic el procés de transformació histològica es considera com el resultat de la progressiva adquisició i acumulació d'alteracions genètiques secundàries i no com el resultat d'una única lesió. Aquestes lesions genètiques es tradueixen en la disregulació de vies moleculars que afecten la proliferació, el control del cicle cel·lular i l'apoptosi en els casos transformats. Tampoc a aquest nivell existeix una alteració única en els casos transformats tot i que en alguns casos les diferents alteracions genètiques acaben afectant vies de regulació cel·lulars similars, per exemple la sobreexpressió de BCL-6 produeix una supressió de p53.<sup>109</sup> S'han descrit reordenaments de *C-MYC* en un 8% de casos transformats, tenint probablement l'alteració d'aquesta via una especial rellevància en la transformació limfoblàstica.<sup>88,97,110</sup> Més freqüentment, fins a un 73% de casos, s'observen inactivacions dels gens *CDKN2A* (*p16INK4A* ARF) i *CDKN2B* (*p15 INK4B*) a través de delecions, mutacions o hipermetilació.<sup>111-113</sup> Les mutacions de TP53 es detecten també en un 30% de casos transformats, una proporció similar a la que s'observa en els LDCG *de novo*. Aquestes s'adquireixen durant la fase indolent del LF i probablement predisposen a la transformació. També s'han descrit mutacions a nivell del gen *BCL-2* translocat.<sup>114</sup> Respecte a les alteracions de *BCL-6*, gen amb un paper central en els LDCG *de novo*, s'han objectivat més translocacions i delecions en els LF que posteriorment es transformen, un 39%, respecte als casos que no ho fan que les presenten en un 14%. A més, en la majoria de casos transformats s'hi troben altres alteracions com mutacions. No obstant, donat que el resultat final són tant guanys com pèrdues de BCL-6 no sembla que aquest gen sigui indispensable per a la transformació.<sup>115,116</sup>

Un mecanisme alternatiu per l'adquisició de mutacions a nivell de proto-oncogens com *BCL-6*, *MYC*, *PAX-5*, *PIM1* i *RHOH* és a través de la hipermutació somàtica aberrant induïda per una inadequada activitat d'AID (activated-induced cytidine deaminase), que s'ha demostrat com un mecanisme d'inestabilitat gènica important en els LDCG *de novo*.<sup>117</sup> Aquest mecanisme existeix tant en el LF com en els LF transformats, tot i que hi ha dades contradictòries en quant a la seva possible implicació en el procés de la transformació histològica.<sup>118,119</sup>

Els diferents estudis de perfils d'expressió gènica comparant casos amb LF i LF transformat han mostrat un baix grau de concordança en els seus resultats.<sup>21,87,88,120,121</sup> Alguns d'aquests estudis però, coincideixen en assenyalar que en un subgrup de casos transformats predominaria una signatura gènica de proliferació amb alteracions a TP53, CDKN2A, c-REL i c-MYC.<sup>87,88</sup> Recentment utilitzant anàlisis de mòduls de xarxa a partir d'estudis de perfils d'expressió gènica en casos amb LF i LF transformat s'ha demostrat que l'elevada expressió de signatures de programes de transcripció típics de cèl·lules stem embrionàries pluripotents seria fonamental en el mecanisme de la transformació histològica en el LF.<sup>122</sup>

Recentment, les anàlisis de *single nucleotide polymorphism* (SNP) han permès identificar zones de disomia uniparental adquirida (aUPD) en el LF i en el LF transformat. Aquest fenomen es creu que té lloc durant la recombinació mitòtica cel·lular, i condueix a l'aparició d'homozigosi per a una lesió genètica preexistent sense donar lloc a alteracions en el nombre de còpies gèniques. Així doncs, per mitjà d'aquest mecanisme s'ha observat alteracions en *CDKN2A* i TP53 en casos transformats, i també una nova àrea amb aUPD en el cromosoma 16p en casos de LF que correlaciona amb una curta supervivència lliure d'event i amb el risc de transformació.<sup>123,124</sup> A més, per mitjà d'aquest tipus d'anàlisis s'ha objectivat



com la majoria dels casos transformats s'haurien originat de forma divergent del LF a partir d'un precursor comú, en tant que en la resta hi hauria una transformació directa des d'una clona del LF. Aquesta idea també es suporta a partir dels estudis epigenètics dels patrons de metilació en els limfomes agressius, en el LF i en els LF transformats.<sup>125,126</sup>

A la llum d'aquestes troballes es creu que a través de mecanismes indubtablement complexes i heterogenis que induirien l'acumulació de dany genètic, el LF es transformaria progressivament en un limfoma amb un major nombre de centroblastes, amb pèrdua de l'arquitectura fol·licular i desaparició de les xarxes de cèl·lules dendrítiques fins esdevenir indistingible d'un LDCG.

### 2.3.2. Microambient

El treball desenvolupat per *Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project* (LMPP) ha permès acumular evidències significatives de la important contribució de les cèl·lules no tumorals del microambient del LF en la biologia i el pronòstic d'aquest tumor.<sup>20</sup> Aquest treball realitzat en 191 pacients establí que la presència de les cèl·lules no tumorals en les biòpsies, particularment les cèl·lules T responsables de la resposta immune tipus 1 (RI-1) i els macròfags configurant la resposta immune tipus 2 (RI-2) constituïen les signatures d'expressió gènica predominants capaces d'establir un pronòstic pel LF. El fet que aquests perfils d'expressió gènica es trobin presents ja en el moment del diagnòstic del LF suggereix que una bona part del pronòstic del LF vindria condicionat des de bon començament. Quan mitjançant les tècniques de microarrays s'ha adreçat la qüestió de si la transformació histològica podria predir-se en base a perfils genètics concrets del LF s'ha demostrat que això no era possible, almenys de moment.<sup>21</sup> En general els diferents estudis d'expressió gènica seqüencials realitzats per tal

d'entendre la transformació histològica han estat poc concordants de forma que no és possible extreure conclusions extrapolables fora de cada estudi concret.<sup>21,88,120,121</sup> No obstant, l'estudi de subtipus cel·lulars immunològics específics en el LF s'ha mostrat útil en identificar subgrups de pacients amb un pronòstic diferent i també el risc de transformació histològica. La presència d'un elevat nombre de cèl·lules T reguladores (FOXP3+) correlaciona amb una millor supervivència dels pacients amb LF, en tant que en el moment de la transformació histològica s'observa una franca disminució d'aquest subtipus cel·lular.<sup>127</sup> La distribució espacial de cèl·lules T-helper també va resultar predictiva de presentar una transformació precoç<sup>21</sup> i de forma similar un baix nombre de cèl·lules PD-1+ també correlacionava amb el risc de presentar transformació histològica.<sup>128</sup>

## 2.4. Clínica

La freqüència descrita en la transformació histològica del LF és molt variable i oscil·la segons les diferents sèries entre el 10% i el 70% dels pacients.<sup>75-80,82-84,86,129,130</sup> Diferents factors influeixen en aquestes estimacions, d'una banda les incidències més elevades provenen d'estudis autòpsics realitzats dècades enrera,<sup>79,81,84</sup> i d'altra banda, pel que fa a la resta de sèries clíniques cal considerar entre altres causes els criteris de transformació emprats (histològics, citològics o en base a la sospita clínica), la classificació histològica vigent, la política de rebiópsia aplicada i el temps de seguiment de la sèrie. Les dues sèries més actuals, mostren una incidència de transformació en el LF del 3% anual i del 15% en cada nova progressió de la malaltia.<sup>76,82</sup> Pel que fa referència a l'interval des del diagnòstic del LF a l'aparició del LDCG, aquest es situa al voltant dels 3,5 anys, i algunes sèries no identifiquen *plateau* més enllà dels 15 anys.

Des d'un punt de vista clínic, la transformació histològica ha de ser sospitada davant l'aparició de les següents dades: simptomatologia B, ràpid creixement adenopàtic, afectació extraganglionar (excloent el moll d'os), augment de la xifra de la lactat-deshidrogenasa sèrica (LDH), escassa resposta al tractament quimioteràpic o progressió de la malaltia sota el mateix, i, més rarament, hipercalcèmia. Cap d'aquestes dades pot considerar-se específica per la transformació, és més, en alguns casos les dades clíniques que caracteritzen la transformació histològica del LF poden ser fins i tot poc aparents. Tenint en compte les implicacions pronòstiques de la transformació histològica i que la documentació histològica és la única manera d'obtenir amb certesa aquest diagnòstic, es posa de manifest la importància de tornar a biopsiar als pacients en cada recidiva o progressió de la malaltia i en especial davant les situacions clíniques abans esmentades.

En el moment actual, s'està introduint amb força una nova tècnica d'imatge, el FDGC-PET, per l'estadiatge i l'avaluació de resposta dels limfomes no hogkin (LNH). En el cas concret del LF aquesta eina s'està demostrant molt adequada per a la seva avaluació independentment del grau histològic. De moment hi ha poques dades a la bibliografia que avaluin la utilitat del FDGC-PET en el context de la detecció de la transformació histològica en el LF, tot i que sembla que hi hauria diferències significatives entre els casos transformats i els no transformats.<sup>131-133</sup>

La influència de les característiques inicials dels pacients amb LF en la progressió histològica s'ha analitzat en diferents d'estudis. Les sèries més antigues van identificar presentar una alta càrrega tumoral, no assolir una remissió completa amb el tractament inicial, una xifra baixa d'albumina sèrica i una  $\beta$ 2-microglobulina elevada com les variables que s'associaven a un major risc de transformació.<sup>77,130</sup> Els estudis més recents confirmen

l'estadi clínic avançat al diagnòstic com el factor predictiu més important de transformació histològica.<sup>76,82</sup>

La possibilitat contemplada inicialment de que el tractament quimioteràpic i/o radioteràpic rebut per al LF incrementés els risc de transformació,<sup>81</sup> fou descartada per l'estudi de Horning & Rosenberg, a l'observar aquests autors que la freqüència de progressió a un LDCG en els pacients en abstenció terapèutica i en els que habien estat tractats era pràcticament superponible, demostrant que aquest fet és inherent a la pròpia malaltia i forma part de la seva història natural.<sup>80</sup> Aquesta discussió ha tornat a activar-se els darrers temps amb la irrupció dels nous tractaments, anàlegs de purines i immunoteràpia, en el context del LF<sup>134</sup> i també en base a noves dades clíniques que suggereixen d'una banda un risc més elevat de transformació en aquells pacients amb LF als que inicialment se'ls fa una aproximació d'abstenció terapèutica,<sup>82</sup> i per una altra banda l'existència d'una menor taxa de transformació en el subgrup de pacients amb LF tractats inicialment amb esquemes que contenen antraciclínics.<sup>76</sup>

El principal interès clínic de la transformació histològica en el LF resideix en les seves implicacions pronòstiques i terapèutiques. Tots els estudis coincideixen en assenyalar mitjanes de supervivència després de la transformació inferiors als dos anys.<sup>76,80-82</sup> En la majoria dels estudis s'han identificat diferents factors capaços de predir una mala evolució després de la transformació, entre els que es troben un estadi clínic avançat, la presència de simptomatologia B, un nivell elevat de LDH sèrica, l'afectació medul·lar, el nombre de tractaments previs rebuts i no obtenir una remissió completa amb el tractament de rescat.<sup>76,77,81,82,86</sup> Amb tot, cal destacar que el subgrup de pacients transformats que presenten un estadi clínic localitzat (I-II), no tractaments previs del LF i que assoleixen una remissió completa amb

el tractament de rescat presenten mitjanes de supervivència de més de 6 anys.

## 2.5. Tractament

En el moment de la transformació histològica entre un 8-24% dels pacients<sup>76,82</sup> tan sols poden ser candidats a tractaments pal·liatius o de suport. En la resta de pacients cal dissenyar una estratègia de rescat tenint en compte les línies de tractament prèvies del pacient i les característiques clíniques de la recaiguda. Els esquemes terapèutics utilitzats en el LF transformat han estat els propis del LDCG de novo, en els darrers anys combinats amb immunoteràpia (anti-CD20).

L'escassa resposta a aquests tractaments junt amb l'alt risc de recidiva fa que en pacients seleccionats, edat < 65 anys i malaltia quimiosensible, pugui oferir-se una consolidació de la resposta amb un trasplantament autòleg de progenitors hemopoètics. Amb aquest procediment es descriuen supervivències als 5 anys del 50% i supervivències lliures de malaltia del 30%.<sup>85,135-140</sup> El seu possible benefici queda condicionat per la posterior aparició de mielodisplàsies i leucèmies agudes secundàries en un 7% i 15% de casos respectivament.<sup>85,135-140</sup> El trasplantament al·logènic també s'ha explorat en aquests pacients tot i que l'experiència acumulada és menor en comparació al trasplantament autòleg i cal considerar-lo un tractament no estàndar. A més, les poques sèries publicades tot sovint agrupen casos transformats amb casos recaiguts o amb altres histologies. Aquest fet fa difícil extreure conclusions però semblaria que la toxicitat del procediment i el risc de recaiguda són elevats.<sup>141-145</sup> La sèrie més ampla de pacients amb trasplantament al·logènic convencional són 40 casos, 25 dels quals transformats, i presentava una mortalitat relacionada amb el procediment del 36% als 3 anys amb un risc de recaiguda i una supervivència global als 5

anys del 42% del 23% respectivament. En una petita sèrie de 8 pacients s'han descrit resultats més favorables amb supervivències globals del 66% i supervivències lliures de malaltia del 56% als 4 anys del procediment.<sup>142</sup> Les sèries que han explorat el trasplantament al·logènic amb règims de condicionament reduïts presenten també resultats discordants amb supervivències als 3 anys del 18%<sup>144</sup> i als 4 anys del 60%.<sup>145</sup>

Els assajos clínics amb radioimmunoteràpia (I131 tosimumab i Y90 ibritumomab tiuxetan) en aquests pacients han mostrat resultats interessants, amb respostes globals del 50% i remissions completes en un 30%, però caldria confirmar-los en nous estudis.<sup>28,146,147</sup> Recentment també s'han presentat resultats interessants amb la combinació de rituximab i bendamustina en aquests pacients amb un 66% de respostes tot i que de curta durada.<sup>148</sup>

### 3. Transformació histològica en la leucèmia limfàtica crònica

#### 3.1. Perspectiva històrica

L'any 1928, Maurice Nathaniel Richter, patòleg de la Universitat de Columbia i de l'Hospital Bellevue de Nova York, describí el cas d'un home de 46 anys d'edat que presentava un quadre clínic ràpidament evolutiu caracteritzat per pèrdua de pes, dolor i distensió abdominals, creixement adenopàtic generalitzat, hepatoesplenomegàlia massiva i limfocitosi a la sang perifèrica.<sup>10</sup> L'estudi necròptic permeté observar dos tipus de lesió histològica a nivell ganglionar. D'una banda una proliferació difusa de limfòcits petits esborrant l'arquitectura ganglionar normal compatible amb l'afectació per LLC i la segona constituïda per cèl·lules de gran mida sense semblança a cap tipus cel·lular sanguini, motiu pel qual va considerar-la un "reticulosarcoma" del teixit limfàtic. Després de la descripció inicial de Richter, altres autors comunicaren casos de reticulosarcoma associat a LLC, que ocasionalment foren catalogats com malaltia de Hodgkin degut a la semblança de les cèl·lules neoplàsiques a les de Reed-Sternberg. Aquestes observacions van conduir a que l'any 1964 Lorthoraly i cols. proposessin el terme de síndrome de Richter (SR) per denominar el complex simptomàtic d'aquells pacients amb LLC que desenvolupaven indistintament un reticulosarcoma o una malaltia de Hodgkin.<sup>149</sup> Posteriorment, els termes histològics emprats per referir-se a la SR van evolucionar al ritme de les successives classificacions de les neoplàsies del teixit limfoide.

A l'actualitat, el terme de SR en sentit estricte descriu el desenvolupament d'un limfoma difús de cèl·lules grans B en el curs d'una LLC,<sup>42</sup> en tant que l'aparició d'un limfoma de Hodgkin (LH) en aquests pacients –un fet, per

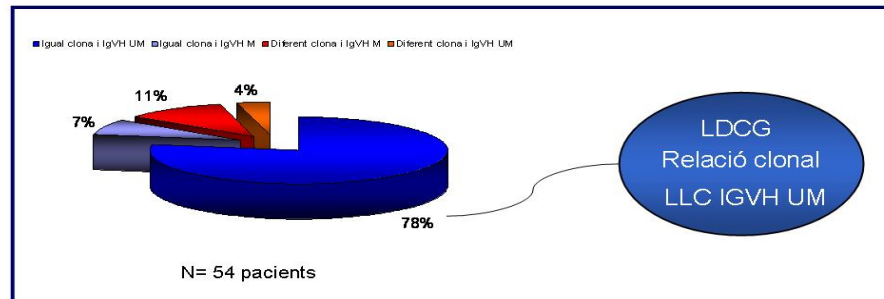
una altra banda, extremadament infreqüent (<1%),<sup>150,151</sup> sembla constituir una entitat diferent.<sup>152,153</sup>

### 3.2. Histologia

El substracte histològic de la SR és, com s'ha indicat previament, un LDCG que des del punt de vista morfològic i immunohistoquímic és pràcticament indistingible del LDCG *de novo*. A diferència d'aquest darrer, pot expressar el marcador de cèl·lules T CD5 –la qual cosa denotaria un possible origen en la LLC– i no presenta reordenament de *bcl-6*, fets comuns per una altra banda en el LDCG *de novo*, la qual cosa implica l'existència de mecanismes patogènics diferents per a ambdues varietats de LDCG.<sup>154</sup>

Pel que fa a la relació clonal entre el LDCG i la LLC cal assenyalar que a diferència del que succeeix en el LF, on virtualment tots els casos presenten una relació clonal, en aquest context tan sols al voltant d'un 80% de casos presenten una clona idèntica en tant que aproximadament el 20% restant de casos les clones tumorals són diferents.<sup>155-160</sup> D'aquests estudis també es desprèn que tot i que el LDCG pot aparèixer tant en LLC IGVH no mutades com mutades, l'associació més freqüent és amb les primeres fins en un 75% de casos aproximadament (Figura 2).





**Figura 2.** Relació clonal i estat mutacional dels casos de LLC que es transformen en un LDCG

És interessant destacar que els estudis biològics dels casos de limfoma de Hodgkin apareguts en el curs evolutiu de la LLC reflecteixen un escenari completament oposat. La relació clonal amb la LLC precedent és encara menys freqüent ja que fins a un 50-60% de casos presenten una clona diferent.<sup>153,155,156,161-164</sup> A més, tot i que el LH pot aparèixer tant en LLC amb IG VH no mutades com mutades, és en aquestes darreres on és més freqüent l'associació.<sup>155,156,164</sup> Una altra particularitat és la presència d'infecció latent pel VEB en les cèl·lules de Reed-Sternberg, especialment en els casos amb una relació clonal diferent.<sup>153,155,156,164</sup>

A més de les situacions abans esmentades cal tenir en compte que històricament s'havia descrit també la transformació prolimfocítica de la LLC, fet considerat avui en dia extremadament infreqüent, a més d'haver-

se descrit diferents associacions amb altres neoplàsies del sistema hematopètic incloent limfoma limfoblàstic,<sup>165</sup> limfomes de linia T,<sup>166,167</sup> mieloma múltiple,<sup>168</sup> tricoleucèmia<sup>169,170</sup> i neoplàsies de cèl·lules dendrítiques<sup>171</sup> entre altres. Els següents subapartats es referiran únicament a la SR, entesa com a l'aparició d'un LDCG en el curs evolutiu de la LLC, a menys que s'indiqui el contrari.

Ocasionalment es poden identificar patrons histològics en la LLC que tot i no acomplir criteris d'una transformació histològica podrien remedar-ne una fase prèvia. Aquests casos s'han denominat LLC en fase accelerada, tot i que mai han estat formalment definits ni des d'un punt de vista histològic ni clínic. Alguns autors hipotetitzen que les LLC accelerades podrien presentar un curs clínic agressiu comparable a la transformació histològica a un LDCG.<sup>172,173</sup>

### 3.3. Biologia

Clàssicament la LLC ha estat considerada una malaltia homogènia de cèl·lules B immadures i immuno-incompetents, poc proliferativa, on l'acumulació cel·lular causada per un defecte en l'apoptosi constituïria el mecanisme oncogènic fonamental.<sup>174</sup> Aquesta visió però s'ha anat modificant amb els avenços realitzats en la darrera dècada. Actualment, la LLC es considera una malaltia heterogènia no tan sols des d'un punt de vista clínic sinó també biològic. Tot i que el seu origen cel·lular continua essent desconegut, la LLC derivaria probablement en tots els casos de limfòcits B amb experiència antigènica que diferirien entre altres aspectes en el nivell de mutacions presents en el gen de la cadena pesada de les immunoglobulines.

La participació del microambient en el manteniment de la supervivència de les cèl·lules de LLC i probablement també en la proliferació d'un subgrup

d'elles, s'està demostrant cada cop més rellevant en la biologia del tumor.<sup>49,175</sup> Així mateix, es fa cada cop més pal·lès que la LLC és una malaltia molt més proliferativa del que inicialment s'havia considerat, quedant probablement restringida aquesta proliferació en el teixit limfoide i el moll d'os. El compartiment proliferatiu en la LLC estaria constituït per cèl·lules grans, prolimfòcits i paraimmunoblasts, que s'agrupen en els centres de proliferació (CP), d'aspecte més clar que la resta de l'infiltrat limfocitari, donant lloc a un patró pseudofol·licular al gangli limfàtic i en menor mesura a la medul·la òssia.<sup>176</sup> Aquests centres de proliferació contenen abundants limfòcits T CD3+, la majoria CD4+, i fins i tot en alguns d'ells pot trobar-se una fina xarxa de cèl·lules dendrítiques, tot i que no poden arribar a considerar-se autèntics centres germinals. Aquests centres de proliferació presenten una expressió diferencial de diversos marcadors en comparació amb l'infiltrat limfocitari tumoral circumdant. Co-expressen de forma intensa survivina i bcl-2, la primera involucrada en la progressió del cicle cel·lular i ambdues amb una funció antiapoptòtica; expressen MUM1/IRF-4, un factor de transcripció important en la diferenciació cel·lular terminal cap a cèl·lula plasmàtica; presenten una major proliferació mesurada amb l'antigen Ki-67, així com una major intensitat d'expressió de CD20 i CD23 i per contra una menor expressió de CD27.<sup>176,177</sup> Aquestes observacions junt amb les dades moleculars que suggereixen cada cop més un important paper de l'estimulació mediada pel receptor de la cèl·lula B (BCR) i un putatiu (auto)-antigen en la patogènesi de la LLC,<sup>178,179</sup> reflecteixen la importància del microambient tissular en aquesta malaltia.

Els mecanismes biològics implicats en el desenvolupament d'un limfoma d'alt grau en el context d'una LLC són probablement múltiples i tan sols parcialment coneguts.

Des d'un punt de vista citogenètic, no existeixen anomalies característiques de la SR podent-se detectar en aquests casos les mateixes alteracions que s'observen al diagnòstic o durant el curs de la LLC, freqüentment la presència de +12, deleció 11q23 i 17p.<sup>180,181</sup> En aquests pacients sí s'ha detectat, no obstant, una major freqüència de cariotips complexes<sup>182,183</sup> amb la qual cosa s'ha suggerit que l'existència d'alteracions cariotípiques múltiples predisposaria als pacients amb LLC a l'aparició d'un LDCG.<sup>182</sup> Estudis amb *CGH* demostren l'increment en el nombre promig de desequilibris cromosòmics d'acord als estadis inicials o els més avançats en la LLC, essent aquest fet especialment més marcat en la SR, a més d'una alta freqüència de pèrdues a nivell de 8p i del cromosoma 9.<sup>184</sup> L'existència d'instabilitat genètica en el context de la SR s'ha demostrat en diferents estudis d'anàlisi de microsatèl·lits i de pèrdua d'heterozigosi.<sup>185-187</sup> L'adquisició d'alteracions oncogèniques de gens reguladors del cicle cel·lular i la inactivació de gens supressors de tumors, entre ells alteracions a nivell de p53, p16INK4a, p21Waf1, p27, ciclina D1 i C-MYC també han estat descrits en aquest context.<sup>112,184,188-190</sup> Les alteracions en la via de senyalització de p53 són molt freqüents, tant en forma de mutacions a TP53 com delecions homozigotes de INK4a/ARF, trobant-se presents en un 60% de les SR.<sup>60,190,191</sup> No obstant, les mutacions de TP53 en el moment del diagnòstic no incrementa el risc d'aparició de la SR.<sup>158</sup>

Recentment també s'ha descrit una potencial implicació del BCR i de la maquinària d'hipermutació somàtica de les immunoglobulines en el procés de transformació histològica.<sup>157-159</sup> D'una banda la SR apareix de forma preferent en LLC sense mutacions en el gen de les immunoglobulines, i fins i tot s'ha correlacionat en alguns treballs que l'ús de IGVH4-39 s'observa amb més freqüència en els casos de LLC que acaben per desenvolupar una transformació histològica. D'altra banda, en els casos de SR s'ha demostrat com els nivells d'AID incrementen de forma marcada

respecte el component de baix grau i a més apareixen de forma aberrant mutacions a nivell de diferents proto-oncogens (*c-MYC*, *RhoH*, *Pax-5* i *Pim-1*) tot i que no s'adquireixen mutacions a nivell del gen de les immunoglobulines.<sup>157</sup> Alguns treballs però suggereixen que aquest mecanisme és clarament menys freqüent del que té lloc en els LDCG *de novo*.<sup>119</sup>

L'expressió de CD38 per les cèl·lules tumorals de la LLC és un mecanisme per tal de proporcionar senyals de proliferació i supervivència a la cèl·lula. Des d'un punt de vista clínic l'expressió de CD38 té implicacions pronòstiques negatives i a més s'ha descrit com un polimorfisme en aquest gen, la presència d'un al·lel G, s'associa a un risc augmentat de patir una SR.<sup>192</sup>

Alguns autors han especulat sobre l'impacte que pot tenir en el desenvolupament de la SR l'alteració del sistema immune associat amb la pròpia LLC o induït pels tractaments actuals com anàlegs de purines i anticossos monoclonals com l'alemtuzumab.<sup>193</sup> En aquest sentit estan descrits casos de transformacions amb una clara relació temporal amb aquests tractaments i en ocasions amb la presència del virus d'Epstein-Barr (VEB) integrat en les cèl·lules tumorals.<sup>134,194,195</sup>

Així mateix, el virus d'Epstein-Barr s'ha vist implicat en molts dels casos de limfoma de Hodgkin originats en pacients amb LLC.<sup>155,196</sup> En canvi, la contribució del VEB en la SR és probablement poc rellevant, ja que en les sèries de SR més extenses s'ha objectivat entre un 13 i un 16% de casos amb positivitat per al VEB en les cèl·lules tumorals.<sup>173,197</sup>

### 3.4. Clínica

Les sèries clíniques indiquen que la SR es diagnostica en un 2-4% dels pacients amb LLC<sup>183,198</sup> i fins a un 5% més de pacients presenten una sospita clínica que no arriba a ser confirmada histològicament.<sup>173</sup> En aquest sentit, els estudis necròpsics realitzats fa unes dècades situaven la freqüència de la troballa d'un LDCG en aquests pacients entre el 8 i el 10%,<sup>199,200</sup> la qual cosa evidencia que una gran part dels casos de SR no es diagnostiquen. A més, en una sèrie retrospectiva<sup>201</sup> va observar-se que la freqüència de SR en pacients joves (<55 anys) era significativament superior (5.9%) que la observada en els majors de 55 anys (1.2%), aquest fet s'explicaria per la menor freqüència d'estudis biòptics en els pacients d'edat avançada. La incidència acumulada de SR en una sèrie recent és del 13,6% (IC 95%: 7-20%) i 16,2% (IC 95%: 8-24%) als 5 i 10 anys respectivament.<sup>158</sup>

Malgrat que no hi ha troballes clinico-analítiques patognomòniques, la SR comporta habitualment un canvi sobtat en el curs de la LLC en forma d'aparició de simptomatologia sistèmica (febre, pèrdua de pes i sudoració vespertina), deteriorament de l'estat general i ràpid creixement d'adenopaties que pot ser asimètric.<sup>158,183,198,202,203</sup> La presència de massa bulky retroperitoneal es constata fins en un 23% dels casos i l'afectació extranodal fins a un 41%.<sup>183</sup> Les principals localitzacions extranodals són el tracte gastro-intestinal,<sup>204,205</sup> sistema nerviós central,<sup>206,207</sup> pulmó, ronyó, pell, testicles i afectació ocular. En ocasions la transformació s'esdevé a nivell de moll d'os i de forma excepcional poden fins i tot observar-se immunoblastes circulant a sang perifèrica. El paràmetre analític més constantment present en la SR és l'elevació important de la xifra de LDH sèrica, marcador de proliferació tumoral (> 80% dels casos).<sup>183</sup> També de forma ocasional s'ha descrit l'aparició de paraproteinèmia i de forma més

infreqüent d'hipercalcèmia que sol associar-se a lesions osteolítiques i s'ha relacionat amb la secreció del peptid relacionat amb la parathormona.<sup>208,209</sup>

El conjunt d'aquestes troballes o la presència d'alguna d'elles en un pacient amb LLC han de fer sospitar l'existència d'una SR i obliguen a descartar aquesta possibilitat mitjançant una biòpsia del teixit en el que se suposa que s'està produint la transformació histològica per tal d'obtenir un resultat valorable. La biòpsia és, per una altra banda, la única metodologia que permet efectuar un diagnòstic de certesa de la SR, d'aquí que, degut a l'edat avançada i el mal estat general de la majoria d'aquests pacients amb la consegüent dificultat per a realitzar estudis biòptics, el diagnòstic de SR es vegi dificultat. En ocasions, l'anàlisi citològica dels teixits afectes pot també orientar el diagnòstic.<sup>173</sup>

D'una altra banda, la utilitat de proves d'imatge com Ga-67 SPECT i a l'actualitat el FDG-PET s'han evaluat en el context de la SR. El Ga-67 SPECT s'ha demostrat poc útil per a la detecció de la SR donat que la captació de Gal·li dels teixits no es correlaciona amb el grau de proliferació donant lloc a resultats discordants.<sup>210,211</sup> Per contra, comencen a haver-hi evidències que la FDG-PET, cada cop més rellevant en l'estadiatge i l'avaluació de la resposta en els LNH i LH, podria ser una tècnica molt útil en la detecció de la SR en els pacients amb LLC: S'ha descrit una sensibilitat del 91% i una especificitat del 80%, amb un valor predictiu negatiu del 97% però tan sols un valor predictiu positiu del 53% per a la detecció de la SR. Aquest darrer valor s'explica per la positivitat del FDG-PET en pacients on la biòpsia finalment objectivà LH, LLC en fase accelerada i altres neoplàsies secundàries. Aquestes dades evidencien un cop més la necessitat d'obtenir una confirmació histològica en aquests pacients, tot i que el FDG-PET pot ser una bona eina per a donar suport a la sospita clínica i identificar l'àrea a biopsiar.<sup>131,172</sup>

L'interval entre el diagnòstic de LLC i l'aparició de la SR oscil·la entre els dos i els quatre anys en la majoria dels pacients,<sup>158,183,203</sup> tot i que en ocasions, com en el cas descrit per Richter,<sup>10</sup> ambdós diagnòstics són simultanis i fins en un 38% de casos aquest interval és superior als 5 anys.<sup>173</sup> Al diagnòstic de la SR, la LLC es troba generalment en activitat tot i que en la sèrie de Robertson i cols, s'observà en una proporció important de casos l'aparició de la SR en pacients amb LLC en remissió completa, la qual cosa s'atribuí a la major capacitat dels anàlegs de purines per induir resposta en la LLC i la falta d'activitat d'aquests fàrmacs en els limfomes agressius.<sup>183</sup> Pel que fa referència a l'extensió del LDCG de la SR, la seva apreciació es veu dificultada per l'habitual coexistència de la LLC, i tot i la creença de que la SR podria ser un fenomen local, els estudis necròptics han demostrat que en la majoria dels casos es tracta d'un procés disseminat.<sup>199,212</sup>

La única sèrie publicada on s'han analitzat els factors de risc per a la SR identifica diferents paràmetres biològics i clínics en el moment del diagnòstic de la LLC.<sup>158</sup> Entre els biològics, l'estat IGVH no mutat, l'ús de IGVH4-39, l'absència de del13q14 i l'expressió elevada de ZAP-70 i CD38. Dins els paràmetres clínics la mida ( $\geq 3$  cm) i el nombre ( $\geq 3$  àrees) de ganglis afectats, la presència d'un estadi de Binet B o C i la xifra de LDH sèrica elevada al diagnòstic. La mida ganglionar ( $\geq 3$  cm) i l'absència de deleció 13q14 van resultar variables pronòstiques independents per al risc de SR en l'anàlisi multivariat.

L'impacte dels tractaments previs sobre l'aparició de la SR és un tema de discussió recurrent, especialment des de la introducció dels anàlegs de les purines com a tractament d'elecció en la LLC. Està descrit que la incidència de transformació incrementa amb el nombre de línies de tractament prèvies.<sup>198</sup> Alguns grups suggereixen que amb l'ús de la fludarabina la



incidència de la SR en les seves sèries hauria augmentat i de fet, alguns pacients haurien presentat la SR als pocs mesos d'haver rebut aquest tractament.<sup>134,193,195</sup> No obstant, en el moment actual no hi ha suficients evidències que suportin aquestes observacions.

### 3.5. Tractament

A diferència del que passa en el LDCG *de novo*, els resultats del tractament en la SR –que ha de ser el propi dels LDCG- són generalment molt pobres. Això queda reflectit en una tasa de remissions del voltant d'un 40% i una mitjana de supervivència que se situa en diferents sèries entre els 5 i 8 mesos.<sup>60-62,173,183,203,213,214</sup> La recent incorporació de la immunoteràpia en el tractament dels LNH, especialment l'anti-CD20, sembla que podria millorar la tasa de remissions obtingudes tot i que fan falta sèries més àmplies per poder confirmar-ho.<sup>158,173</sup> Un recent anàlisi de la combinació OFAR (oxiplatí, fludarabina, citarabina i rituximab) en casos de SR no ha obtingut resultats gaire esperançadors amb un 50% de respostes globals i una mitjana de supervivència de 10 mesos.<sup>60-62,215</sup> Tots els estudis coincideixen en mostrar una supervivència més perllongada en aquells pacients que obtenen una resposta completa, d'aquí que cal implementar estratègies de consolidació tipus trasplantament en tots aquells pacients en que aquesta aproximació sigui possible. En aquest sentit, caldran més estudis per establir l'efecte beneficiós en la utilització del trasplant al·logènic com a part del tractament post-remissió en aquests pacients.<sup>173,216</sup>

La sèrie més àmplia publicada en pacients amb SR, amb un total de 148 casos, ha identificat diferents paràmetres en el moment de la transformació com l'estat general, la xifra de LDH sèrica, la xifra de plaquetes, la mida tumoral i el nombre de línies de tractaments prèvies que són independents en l'anàlisi multivariat per a la supervivència d'aquests pacients.<sup>173</sup>

Tot i el mal pronòstic a curt termini que comporta la SR, alguns pacients presenten supervivències perllongades després d'aconseguir-se la remissió completa del LDCG. Aquest fet sembla estar relacionat amb els estadis localitzats de la SR i amb la simultانيتat dels diagnòstics de la LLC i la SR,<sup>173,183,203</sup> essent aquestes unes circumstàncies similars a les observades en els limfomes fol·liculars transformats.



## **II. HIPÒTESIS I OBJECTIUS**



## Hipòtesis de treball

La transformació histològica a un limfoma d'alt grau és un fet ben conegut en les síndromes limfoproliferatives cròniques indolents, incloent el LF i la LLC, i diferents estudis han demostrat que la seva aparició condiona un pronòstic clarament desfavorable en els pacients. En el LF aquesta situació ha estat abundantment estudiada en el passat en diferents series. No obstant, en el moment de plantejar-nos l'estudi mancava una anàlisi extensa dels factors pronòstics associats a la transformació histològica, en especial, en sèries grans i ben caracteritzades de pacients amb LF. Així mateix, també mancava un estudi de la incidència d'aquest esdeveniment en sèries amb uns criteris ben definits per al diagnòstic de la transformació.

La hipòtesi de treball plantejada en el primer estudi consistí en que diferents característiques clíniques i biològiques al diagnòstic del LF podien associar-se a un major risc de presentar una ulterior transformació histològica. La identificació d'aquestes variables pronòstiques permetria millorar la identificació de pacients amb LF que poguessin trobar-se en un grup de risc per a presentar aquest fenomen. Aquest fet podria millorar el maneig clínic dels pacients amb LF, tan pel que fa al seguiment com fins i tot en la decisió d'una estratègia terapèutica més individualitzada.

Pel que fa al segon treball que varem decidir centrar en la LLC, se'ns presentava un escenari més complex per a l'estudi de la transformació histològica. Cal tenir en compte que en aquesta síndrome limfoproliferativa crònica l'obtenció d'una biòpsia tissular se sol indicar en la gran majoria dels casos per tal de descartar una sospita clínica de transformació histològica. Històricament, s'han reconegut patrons histològics que tot i no acomplir criteris per considerar-los una transformació a un LDCG, també

difereixen d'una afectació típica per LLC, poc proliferativa. Molts d'aquests casos es descriuen sota el terme LLC "accelerada", tot i que mai han estat definits els criteris histològics per identificar-los. Nogensmenys, el seu significat clínic i la seva base biològica són totalment desconeguts, tot i que alguns autors haurien suggerit que podrien tenir un comportament clínic molt agressiu comparable amb una transformació histològica. La hipòtesi d'aquest segon treball ha estat que algunes característiques histològiques en relació amb la proliferació de la LLC podrien tenir un impacte pronòstic en la supervivència dels pacients. La seva identificació ens permetria establir uns criteris histològics per tal de definir la LLC "accelerada". L'estudi comparatiu clínic i biològic d'aquests casos junt amb els dels casos amb LLC "no accelerats" i els casos amb transformació a LDCG podrien aportar informació clínic rellevant.

## Objectius

### **Primer treball:**

1.1. Analitzar la incidència i els factors de risc per a la transformació histològica en el limfoma fol·licular (LF).

1.2. Estudiar l'evolució dels pacients amb transformació histològica i els factors de risc en el moment de la transformació.

### **Segon treball:**

2. Analitzar les diferents característiques histològiques relacionades amb la proliferació tissular en la LLC i correlacionar-les amb la supervivència dels pacients des del moment de la biòpsia.

2.1. Definir els criteris histològics que permeten identificar la leucèmia limfàtica crònica (LLC) "accelerada".

2.2. Estudiar les característiques clínico-biològiques i el pronòstic dels pacients amb LLC "accelerada" en comparació amb els casos "no accelerats" i amb la transformació histològica a LDCG.





### **III. RESULTATS**



## Primer treball

### Resum

La transformació histològica a un limfoma d'alt grau és un fenomen ben conegut en els pacients amb limfoma fol·licular (LF) i condiona un pronòstic desfavorable. L'objectiu del present treball fou analitzar la incidència i els factors de risc per a la transformació histològica en una sèrie gran i ben caracteritzada de pacients amb LF.

Es van considerar per a l'estudi 276 pacients amb LF diagnosticats en un únic centre. La mitjana d'edat fou de 54 anys, amb una distribució per sexes de 139 homes i 137 dones i per subtipus histològics de LF, un 42% grau 1, un 51% grau 2 i un 7% grau 3. En la majoria de casos el tractament inicial fou una quimioteràpia combinada. La mitjana de supervivència global de la sèrie fou de 11,3 anys.

S'observà transformació histològica en 30 dels 276 casos (11%) després d'una mitjana de seguiment de 6,5 anys, amb una incidència acumulada del 15% i del 22%, a 10 i 15 anys, respectivament. Tots els casos de transformació histològica van correspondre a un LDCG. Les variables al diagnòstic del LF que es van associar a transformació histològica van ser el grau 3 histològic, >4 territoris nodals afectats, LDH i beta-2-microglobulina sèriques elevades, FLIPI i IPI d'alt risc. En l'anàlisi multivariada, el grau 3 histològic i el FLIPI mantingueren el seu significat pronòstic. Si es consideraven a l'anàlisi tan sols els LF amb grau histològic 1 i 2, únicament el FLIPI correlacionava amb el risc de transformació histològica. Vint-i-vuit pacients van rebre tractament de rescat després de ser demostrada la seva transformació histològica, assolint una taxa de remissions completes del 52%. La mitjana de supervivència després de la transformació histològica

## *Resultats*

fou de 1,2 anys. Sis dels 13 pacients que van assolir una remissió completa amb el tractament de rescat estaven vius més enllà dels 5 anys.

En base als resultats obtinguts en aquest estudi es pot concloure que les variables més importants que s'associen a la transformació histològica del LF són el FLIPI i el grau histològic.

# The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) and the histological subtype are the most important factors to predict histological transformation in follicular lymphoma

E. Giné, S. Montoto, F. Bosch, L. Arenillas, S. Mercadal, N. Villamor, A. Martínez, L. Colomo, E. Campo, E. Montserrat & A. López-Guillermo\*

*Institute of Hematology and Oncology, Department of Hematology and Hematopathology Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain*

*Received 3 April 2006; revised 9 June 2006; accepted 13 June 2006*

**Background:** Histological transformation (HT) is a well-known event in patients with follicular lymphoma (FL) conferring an unfavorable prognosis. The aim of the study was to analyze incidence and risk factors for HT in a large series of FL patients.

**Patients and methods:** 276 patients (median age: 54 years; M139/F137) diagnosed with FL (42% grade 1, 51% 2, 7% 3) in a single institution were studied. Initial treatment consisted of combined chemotherapy in most cases. Median survival was 11.3 years. Main clinic and biological variables were assessed for HT and survival.

**Results:** 30 of 276 patients (11%) presented HT after a median follow-up of 6.5 years, with a risk of 15% and 22% at 10 and at 15 years, respectively. All HT corresponded to diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Grade 3 histology, nodal areas >4, increased LDH and  $\beta_2$ -microglobulin, and high-risk IPI and FLIPI were associated with HT. In multivariate analysis, grade 3 histology and FLIPI retained prognostic significance. Only FLIPI predicted HT in grade 1–2 patients. 28 patients received salvage treatment for HT, with a CR rate of 52%. Median survival from transformation was 1.2 years, with 6/13 CR patients being alive >5 years after HT.

**Conclusion:** FLIPI and histology were the most important variables predicting HT. Upon HT, only patients achieving CR reached prolonged survival, thus emphasizing the need for effective therapies once this event occurs.

**Key words:** follicular lymphoma, transformation, FLIPI

## introduction

Follicular lymphoma (FL) is characterized by an indolent clinical course, with a relatively long survival, but with a continuous pattern of relapses resulting in a currently incurable disease. Moreover, as in other indolent lymphoid disorders, histological transformation (HT) into a high-grade lymphoma can be observed in an important proportion of patients. HT is associated with a progressive clinical course, poor response to treatment and short survival [1–3]. The biological mechanisms underlying disease transformation are not completely understood, but accumulation of secondary genetic alterations due to genetic instability [4], nonrandom chromosomal changes [5–7] and specific genetic alterations involving *c-MYC* [8], *p53* [9–10], *p16<sup>INK4A</sup>*, *p15<sup>INK4B</sup>* [11–12] and *BCL-6* [13] have been related to this event. HT has been usually considered unrelated to prior therapies in FL because the

classical observation of a similar incidence of such a complication either in patients receiving treatment or in patients under a wait and watch policy [14]. However, in some studies it has been suggested that treatment with newer agents such as purine analogs or monoclonal antibodies might facilitate HT [15].

The incidence of HT ranges from 10 to 70% in different series [1, 3, 16–17]. This wide range of incidence is probably due to the heterogeneous definition of HT in different studies, as well as to the difficulties in obtaining a diagnostic biopsy when HT is clinically suspected. Thus, it is of note that in necroptic studies up to 70% of patients with FL showed evidence of HT when all the lymph node territories were assessed [18–19]. Since HT is a very unfavorable event in the history of patients with FL, an accurate prediction of HT development could be of importance. However, prognostic studies on HT are relatively scarce, probably because of the above mentioned difficulties. Classical variables associated with high risk of HT are not achieving CR after initial therapy, as well as low serum albumin, and high serum  $\beta_2$ -microglobulin at diagnosis [3]. To the best of our knowledge, in spite of several preliminary data [20, 21], no

\*Correspondence to: Dr A. López-Guillermo, Department of Hematology, Hospital Clínic Villarroel n° 170, 08036-Barcelona, Spain. Tel: +34-93-2275475. Fax: +34-93-2275484. E-mail: alopezg@clinic.ub.es

studies have been formally published on the value of the FLIPI in predicting HT in patients with FL.

The treatment of HT is not well established. Overall, the prognosis after HT is poor with a median survival inferior to one year in most series using CHOP-like regimens as salvage treatment [3]. Patients with chemosensitive disease could benefit from more intensive therapies, including autologous stem-cell transplantation. With the latter approach, about 30% of disease-free survival at 5 years has been observed in selected series [22–24]. This encouraging data need to be confirmed in series with a longer follow-up [16, 22, 25].

The aim of the present study was to analyze the risk of HT in a large series of patients from a single institution homogeneously diagnosed, treated and followed-up. In addition, treatment results after HT are reported.

## patients and methods

### patients: features at diagnosis and initial treatment

Two hundred and seventy six patients (median age, 54 years; male/female distribution: 139/137) consecutively diagnosed with FL between January 1977 and January 2004 in a single institution were the basis for this study. The histological distribution according to the WHO classification [26] was as follows: grade 1, 104 cases (42%); grade 2, 125 cases (51%); grade 3, 18 cases (7%); 29 patients (11%) could not be subclassified. Histological review had been performed in most cases by EC and AM for previous analyses [27, 28]. For the current study, the initial biopsies and those at the moment of transformation were specifically reviewed by EC and AM.

Twenty-eight patients (10%) presented in stage I, 25 (9%) stage II, 45 (16%) stage III, and 178 (65%) in stage IV Ann Arbor disease. Extranodal involvement could be demonstrated in 179 patients, including bone marrow in 157 cases (60% of assessable patients). The distribution of the patients according to the FLIPI [29], assessable in 253 patients (92% of the series), was the following: low-risk, 97 patients (38%), intermediate-risk, 73 (29%) and poor-risk, 83 (33%). In addition, the International Prognostic Index for Aggressive Lymphoma (IPI) [30] was available in 246 patients (89%), the distribution being: low-risk, 116 patients (47%); low/intermediate risk, 80 patients (33%); high/intermediate risk, 27 (11%) and high-risk, 23 patients (9%). Finally, the Italian Lymphoma Index for Follicular Lymphoma (ILI) [31] was assessable in 199 patients (72%) of which 102 (51%) were at low-risk, 50 (25%) at intermediate-risk and 47 (24%) at high-risk (Table 1).

Initial treatment varied over the years, but basically consisted of: alkylating agents alone or in combination, 67 patients (25%); anthracycline-containing regimens (mainly CHOP), 164 patients (60%); fludarabine-based regimens 14 patients (5%); and other treatments, 10 patients (4%). All patients with histology grade 3 were treated with an anthracycline-containing regimen. Sixteen patients (6%) did not receive any therapy at diagnosis. Among 248 assessable patients, 124 (50%) reached CR, 93 (38%) PR, while 31 (12%) were considered as non-responders. After a median follow-up of 6.5 years (range: 0.2–24.7), 144 of 207 responders (70%) eventually showed progression of the disease. The median overall survival was 11.3 years (Figure 1a and b).

### staging, evaluation of response, and follow-up policy

Initial staging procedures included computed tomography of the thorax, abdomen and pelvis, as well as unilateral bone marrow biopsy. In 74 patients diagnosed before 1985, lymphography was performed instead of CT scan. Post-therapy restaging included the repetition of the previously abnormal tests and/or biopsies.

**Table 1.** Initial characteristics of 276 patients with follicular lymphoma

Parameters	No. of patients (%)
Median age (range)	54 years (23–88)
Gender	139M/137 F
Histology ( <i>n</i> = 247)	
1	104 (42%)
2	125 (51%)
3	18 (7%)
ECOG $\geq 2$	40 (14%)
B symptoms ( <i>n</i> = 272)	63 (23%)
Bulky disease	48 (18%)
Extranodal involvement	
None	86 (33%)
1 site	125 (47%)
$\geq 2$ sites	54 (21%)
Bone marrow involvement ( <i>n</i> = 261)	157 (60%)
Ann Arbor stage	
I	28 (10%)
II	25 (9%)
III	45 (16%)
IV	178 (65%)
LDH (>450 U/L) ( <i>n</i> = 241)	51 (21%)
$\beta 2$ -microglobulin (>2.3 mg/dl) ( <i>n</i> = 137)	47 (34%)
FLIPI ( <i>n</i> = 253)	
Low risk (0–1)	97 (38%)
Intermediate (2)	73 (29%)
Poor risk (3–5)	83 (33%)
IPI ( <i>n</i> = 246)	
Low risk (0–1)	116 (47%)
Low/intermediate risk (2)	80 (33%)
High/intermediate risk (3)	27 (11%)
High risk (4–5)	23 (9%)
ILI ( <i>n</i> = 199)	
Low risk (0–1)	102 (51%)
intermediate risk (2)	50 (25%)
High risk ( $\geq 3$ )	47 (24%)

Complete response (CR) was defined as the disappearance of tumor masses and disease-related symptoms, as well as the normalization of the initially abnormal tests and/or biopsies lasting for at least 1 month. Partial response (PR) was considered when measurable disease decreased by at least 50% [32]. Patients not included in these categories and those who died before completing treatment were considered as non-responders.

The follow-up surveillance policy after treatment consisted of physical examination, blood count tests and biochemistry and chest roentgenogram (if initially abnormal) every 3 months during the first year, every 4 months during the second and third year, every 6 months during the next 2 years and every year afterwards. Abdominal CT scans were performed every 6 months during the first year and yearly for the following 5 years when the abdomen was the principal involved site. Molecular follow-up was systematically performed only from 1999 in the setting of a clinical trial.

### criteria of histological transformation

At the time of clinical relapse or progression, a new lymph node biopsy was performed whenever possible. However, as previously described [27], such a procedure was carried out in only one half of the patients due to old age, poor performance status or patient refusal. Transformation into

a high-grade lymphoma was defined as a histological progression into a high-grade lymphoma with a diffuse pattern. Cytological study showing a massive large cell infiltrate was accepted as criteria of transformation in cases with clear clinical suspicion of transformation. On the other hand, in the present series, HT was suspected in eight additional patients in absence of cytological or histological evidence. Six of these eight patients were old people with poor performance status who were candidates for only palliative measures. The remaining two patients, who had a non-biopsied abdominal mass, were treated with adriamycin-containing regimens as for HT. Moreover, in three additional patients, HT was suspected, but the new biopsy was diagnostic of FL grades 1 or 2. According to the above mentioned criteria, none of these cases were considered as having HT.

### parameters evaluated

In each patient the following data were recorded and assessed for the risk of transformation:

- Initial variables: Age, gender, performance status (according to the Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] scale), B-symptoms, histological subtype, hemoglobin, WBC count, lymphocyte count, leukemic expression, platelet count, serum albumin, lactic dehydrogenase (LDH) and  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2M) levels, number of nodal and

extranodal involved sites, presence of splenomegaly, Ann Arbor stage, bulky disease (defined as a tumor diameter  $\geq 7$  cm), bone marrow (BM) infiltration, IPI, ILI, FLIPI.

- Treatment: Monotherapy with alkylating agents or combination chemotherapies without adriamycin versus adriamycin-containing regimens.
- Response to therapy: CR versus PR versus no response. In addition, the following variables at the time of transformation were analyzed for prognosis: (a) clinical data (age, performance status, presence of B-symptoms), (b) tumor extension data (bulky disease, Ann Arbor stage, extranodal involvement, bone marrow involvement, serum LDH,  $\beta$ 2M, hemoglobin), (c) FLIPI, IPI and ILI (d) number of previous relapses, (e) salvage treatment, and (f) response to salvage treatment.

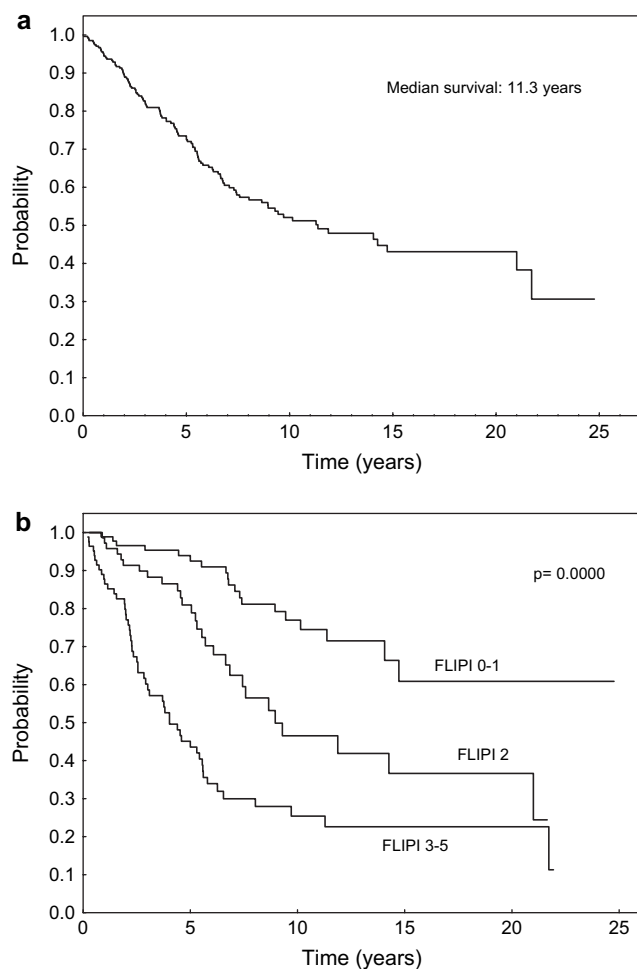
### statistical analysis

The main end-points of the study were the transformation risk and survival from transformation (SFT). In addition, time to treatment failure (TTF) and overall survival (OS) were also analyzed. Survival analysis was performed according to the method described by Kaplan and Meier [33], and the curves compared by the log-rank test [34]. The univariate analysis was carried out for each of the parameters indicated above. All significant prognostic factors in the univariate study were included in a multivariate analysis performed by the stepwise proportional hazard regression method of Cox [35].

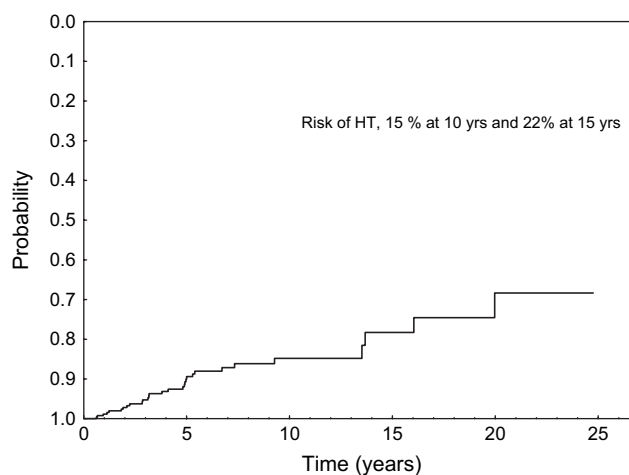
## results

### incidence, diagnosis and clinical features of histological transformation

Thirty of 276 patients (11%) presented HT during the follow-up, with an estimated risk of HT of 15% (95% CI 9–21%) and 22% (95% CI 12–32%) at 10 and at 15 years from diagnosis, respectively (Figure 2). The median time from diagnosis to HT was of 3.5 years (range 0.6 to 20 years). The diagnosis was established by means of a tissue biopsy in 25 patients and by a cytological assessment in five cases. In all cases in whom a biopsy was available, HT corresponded to a



**Figure 1.** (a) Overall survival (OS) of 276 patients with follicular lymphoma. (b) Overall survival (OS) according to FLIPI score at diagnosis.



**Figure 2.** Risk of histological transformation (HT), 15% and 22% at 10 years and 15 years from diagnosis, respectively.



diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Likewise in those patients in whom transformation into a large cell lymphoma type was detected on cytological grounds, clinical criteria consistent with disease transformation as fast growing of lymph nodes, pleural effusions, superior cave vein syndrome or increasing LDH serum levels were also present. In two cases, HT was detected after 22 and 34 months of follow-up, prior to any treatment for FL. In fourteen cases HT was detected at first disease progression and in 14 patients at second or more progressions. Up to 73% of HT patients had received CHOP among previous therapies for FL.

The main features of the 30 patients at the time of HT are listed in Table 2. Of note, 44% of patients presented with ECOG  $\geq 2$ , 33% with B symptoms, 22% with bulky disease, 68% with stage III and IV and 81% with high levels of serum LDH at HT. Up to 48% of the patients who experienced histological transformation presented a high/intermediate or a high-risk IPI score whereas 76% presented an intermediate or high-risk FLIPI score.

### predictors of histological transformation

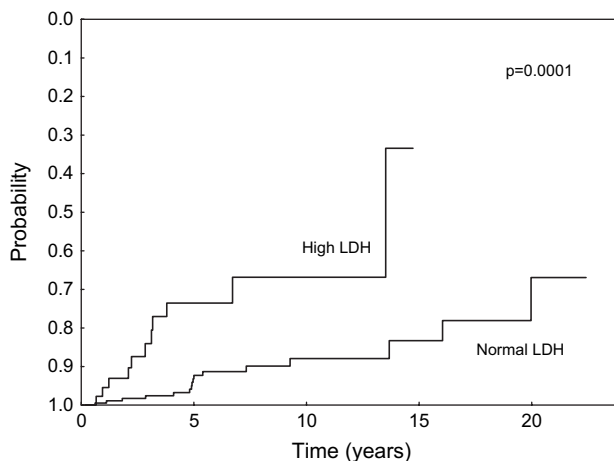
In the univariate analysis, the initial factors associated with HT were the following: grade 3 histology, number of nodal involved areas  $>4$ , high serum LDH (Figure 3) and high serum  $\beta_2$ -microglobulin levels. In addition, the FLIPI also showed a significant statistical correlation with HT ( $P = 0.014$ ) (Figure 4), with those patients with higher FLIPI having a higher

**Table 2.** Main features of 30 patients at the time of histological transformation

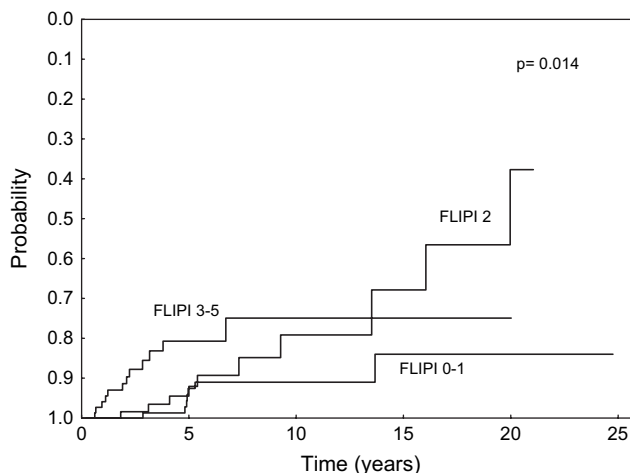
Features	Number of patients (%)
Median age (range)	60 years (29–71)
Gender	18M/12 F
ECOG $\geq 2$	12 (44%)
B symptoms	9 (33%)
Bulky disease	6 (22%)
Extranodal involvement	
none	15 (56%)
1 site	8 (29%)
$\geq 2$ sites	4 (15%)
Bone marrow involvement ( $n = 15$ )	5 (33%)
Ann Arbor stage	
I	5 (20%)
II	3 (12%)
III	7 (28%)
IV	10 (40%)
LDH ( $>450$ U/L) ( $n = 21$ )	17 (81%)
$\beta_2$ -microglobulin ( $>2.3$ mg/dl) ( $n = 15$ )	7 (46%)
IPI	
Low risk (0–1)	8 (32%)
Low/intermediate risk (2)	5 (20%)
High/intermediate risk (3)	6 (24%)
High risk (4–5)	6 (24%)
FLIPI	
Low risk (0–1)	7 (24%)
Intermediate risk (2)	10 (35%)
Poor risk (3–5)	12 (41%)

risk of transformation. Moreover, the IPI was also associated in the univariate analysis with HT, whereas the ILI score did not correlate with HT. Finally, the modality of treatment (chlorambucil or COP versus CHOP) or the degree of response obtained (CR versus no CR) had no influence in HT. Of interest, no case of HT has been detected among the 14 patients that received fludarabine-based regimens to the last follow-up. However, the low number of cases and the short follow-up prevented any definitive conclusions.

A multivariate analysis was performed with the significant variables above described: histological subgroups (1 and 2 versus 3), FLIPI score (low versus intermediate versus poor) and IPI score (low versus intermediate/low versus intermediate/high versus high). LDH was not added because it is included in the FLIPI score and  $\beta_2$ -microglobulin was excluded because it was only available in one half of the patients. Grade 3 histology ( $P = 0.003$ ; relative risk 2.83) and FLIPI ( $P = 0.001$ ; relative risk: 2.35) retained its prognostic significance for HT (Table 3).



**Figure 3.** Time To transformation (TTT) according to LDH serum levels at diagnosis of FL.



**Figure 4.** Time To transformation (TTT) according to FLIPI score at diagnosis of FL.

**Table 3.** Prognostic features for histological transformation in patients with FL

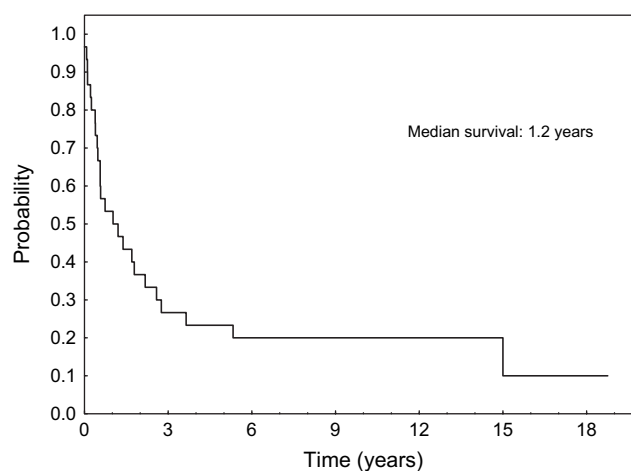
Risk of HT	P value	
Univariate analysis	All patients (n = 276)	Grade 1–2 patients (n = 258)
Grade 3 WHO	0.0066	–
Number of nodal involvement >4	0.0076	ns
Elevated serum LDH	0.0001	0.002
Elevated serum $\beta$ 2-microglobulin	0.0001	0.0009
IPI	0.0002	0.05
FLIPI	0.014	0.0359
ILI	ns	ns
Multivariate analysis		
Grade 3 WHO	0.003; RR 2.83	–
FLIPI	0.001; RR 2.35	0.013; RR 1.97

The same analysis of factors predicting HT was performed in the subset of patients with FL histological grade 1 or 2. In these cases, high LDH and serum  $\beta$ 2-microglobulin levels, FLIPI and IPI score predicted HT (Table 3). In the multivariate study the only parameter retaining prognostic significance for HT was the FLIPI score.

### evolution after histological transformation

Twenty-five of 30 patients (83%) received intensive treatment, whereas the remaining five patients only received palliative measures, including chlorambucil in three of them. Seven patients received CHOP (25%), 17 patients a combination of iphosphamide and VP-16 (VIA) or MINE/ESHAP regimens (54%) and one patient, who refused chemotherapy, radiotherapy alone. CR was reached in 13 cases (52%) and PR in three cases (12%). Seven patients treated either with CHOP or VIA eventually underwent autologous stem-cell transplantation. Five of those seven patients were in CR, one in PR and one has failed to chemotherapy when autologous transplant was performed. Thirteen out of 16 patients in response after salvage treatment eventually relapsed or progressed. In eight cases a new biopsy could be taken, the diagnosis being of DLCL in six cases and FL in two cases.

Twenty-five patients of 30 HT patients having experienced HT died during the follow-up, in 23 cases due to disease progression and in two cases due to apparently unrelated causes (melanoma and fatal cardiac arrhythmia, respectively). The median survival from transformation was 1.2 years (Figure 5). Six patients presented prolonged survival over five years after HT (5.6+, 7+, 9.2+, 11.2+, 15+ and 18.8+ years). Early stage (I–II) ( $P = 0.02$ ), ambulatory performance status ( $\leq 1$ ) ( $P = 0.028$ ), and intermediate/low or low IPI score ( $< 3$ ) ( $P = 0.0046$ ), all at the time of transformation, correlated with longer survival after HT. In addition, the response to salvage therapy was very important to predict survival after HT (5 years survival of 43% versus 0% for patients reaching CR versus no

**Figure 5.** Survival From Transformation (SFT), median of 1.2 years ( $n = 30$  patients).

CR, respectively;  $P = 0.0001$ ). No differences in terms of survival from transformation were seen between the seven patients who underwent intensification with autologous stem-cell transplantation and those that for a variety of reasons were not autografted.

### discussion

This retrospective study on 276 patients consecutively diagnosed of FL in a single institution over a long period of time, confirms that HT is a common event in the natural history of FL. In the present series, the estimated risk of transformation was of 15% and 22% at 10 and 15 years from diagnosis. Although this is in keeping with other series, the risk of transformation reported in the literature range from 10–70%. The main reasons for these discrepancies are probably the difficulties in assessing histological transformation. Thus, despite the basic criterion that HT is the demonstration of histological progression in a lymph node (or other tissue) biopsy, different criteria are applied in the literature. This is understandable, because sometimes it is difficult to obtain diagnostic tissue, for instance in older patients or those with poor performance status. In this sense, the present study is strict, since only those patients with a histological assessment both at diagnosis and at HT, demonstrating the loss of the follicular architecture and the appearance of a diffuse infiltration pattern by a large cell type, were included. Patients under clinical suspicion of HT but without a histological or cytological examination were not considered as transformed in the present series. As a consequence, the real incidence of HT is probably underestimated. In fact, autopsy studies carried out in the past showed higher rates of HT compared to clinical series. Nevertheless, histological assessment of transformation remains a difficult issue to address. Even when follow-up surveillance procedures after FL diagnosis are rightly performed as well as rebiopsy when clinical progression is observed, older age, poor performance status or patient refusal became important limitations.

Predictive factors for HT in patients with FL have been described in previous series [3, 21, 36]. Low serum albumin, high  $\beta$ 2-microglobulin level, and the absence of CR to initial treatment have been noted to be important in large series. In the study of Bastion et al. LDH and histological subtype did not show prognostic importance in predicting HT. This is in opposition to the data herein reported, in which these two variables are among the most important factors to predict HT development, as well as in preliminary data from other institutions where LDH had a significant predictive value for HT. A possible reason for these discrepancies is the low number of patients with grade 3 FL (5% cases) as well as the low availability for LDH levels in the series of Bastion et al. (67%). Moreover, another aspect to take into account is that in this particular study about 25% of HTs were diagnosed on cytological bases and 10% only on clinical criteria.

As expected, FLIPI was an excellent predictor of OS in the present series (Figure 1b). In addition, FLIPI showed to have predictive value for HT (Figure 4). In fact, when a Cox analysis was performed, FLIPI and histological subtype were the only variables retaining prognostic significance. Moreover, FLIPI was the only prognostic factor in patients with histological grade 1–2 FL. On the other hand, IPI also showed a relative value in predicting HT, while ILI did not. The possible role of  $\beta$ 2-microglobulin as a predictor for HT could not be analyzed, because this information was not available in half of the patients.

At the time of HT, a higher proportion of patients presented with a poor performance status, high-risk FLIPI and IPI, increase of LDH and  $\beta$ 2-microglobulin serum levels, compared with the time of diagnosis. In agreement with previous series, HT was also an early event in our FL patients with a median time to transformation of 3.5 years. Despite this fact, no plateau was achieved and HT over 10 years and up to 20 years from diagnosis was seen in several cases.

After HT, a high proportion of patients (80%) in the present series were treated according to intensive chemotherapies (CHOP, VIA and MINE/ESHAP regimens), including autologous transplantation in 25% of cases. Overall response rate was of 64% and the CR rate 52% of cases. However, despite the relatively high rate of CR, median survival from transformation was only 1.2 years. At HT, parameters significantly associated with a longer survival were the degree of response to salvage treatment (CR versus PR versus failure), disease extension (stage I–II versus III–IV), performance status and IPI score. It is of note that FLIPI assessed at the moment of HT was not able to separate patients with different outcome. Thus, a poor clinical outcome is observed in the present series despite salvage treatments. This fact is consistent with OS reported in the literature. Indeed, only those patients with favorable features such as limited-stage disease and low LDH levels are shown to achieve longer OS after autologous transplantation in some reported series [22–24]. In the present study, up to 68% of patients presented with advanced stage and 79% of cases with increased LDH serum levels. This could explain the scarce benefit of autologous transplantation, if any, in the present series, although it has to be pointed out that only seven patients were transplanted, five of them in CR. Of note, up to six patients have presented prolonged survival over five years

after HT. All of them had achieved CR after salvage therapy, which included an autologous transplantation in only one case. These data suggest that although outcome after HT is generally poor, a subset of patients can present prolonged OS. Moreover, it also stresses that obtaining CR with salvage therapy is a crucial event, in agreement with previously published series [14].

In conclusion, HT is a frequent event in the natural history of FL patients, probably underestimated because of the difficulties in reaching a histological diagnosis. The presence of grade 3 FL and high-risk FLIPI at diagnosis of FL are associated with the development of HT. Finally, this event conveys poor prognosis unless a CR is achieved, which unfortunately is not frequent. Improving salvage therapies is therefore crucial to prolonging survival in these patients.

## acknowledgements

Supported by grant FIS- PI03/0473 Spanish Ministry of Health.

## references

- Hubbard SM, Chabner BA, DeVita VT et al. Histologic progression in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1982; 59(2): 258–264.
- Oviatt DL, Cousar JB, Collins RD et al. Malignant lymphomas of follicular center cell origin in humans. V. Incidence, clinical features, and prognostic implications of transformation of small cleaved cell nodular lymphoma. *Cancer* 1984; 53(5): 1109–1114.
- Bastion Y, Sebban C, Berger F et al. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 1997; 15(4): 1587–1594.
- Nagy M, Balazs M, Adam Z et al. Genetic instability is associated with histological transformation of follicle center lymphoma. *Leukemia* 2000; 14(12): 2142–2148.
- Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM et al. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med* 1987; 316(2): 79–84.
- Richardson ME, Chen QG, Filippa DA et al. Intermediate- to high-grade histology of lymphomas carrying t(14; 18) is associated with additional nonrandom chromosome changes. *Blood* 1987; 70(2): 444–447.
- Armitage JO, Sanger WG, Weisenburger DD et al. Correlation of secondary cytogenetic abnormalities with histologic appearance in non-Hodgkin's lymphomas bearing t(14; 18) (q32; q21). *J Natl Cancer Inst* 1988; 80(8): 576–580.
- Yano T, Jaffe ES, Longo DL, Raffeld M. MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood* 1992; 80(3): 758–767.
- Sander CA, Yano T, Clark HM et al. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993; 82(7): 1994–2004.
- Davies AJ, Lee AM, Taylor C et al. A limited role for TP53 mutation in the transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2005; 19(8): 1459–1465.
- Pinyol M, Cobo F, Bea S et al. p16 (INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998; 91(8): 2977–2984.
- Elenitoba-Johnson KS, Gascoyne RD, Lim MS et al. Homozygous deletions at chromosome 9p21 involving p16 and p15 are associated with histologic progression in follicle center lymphoma. *Blood* 1998; 91(12): 4677–4685.
- Akasaka T, Lossos IS, Levy R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood* 2003; 102(4): 1443–1448.

14. Yuen AR, Kamel OW, Halpern J, Horning SJ. Long-term survival after histologic transformation of low-grade follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1995; 13(7): 1726–1733.
15. Cohen Y, Da'as N, Libster D et al. Large-cell transformation of chronic lymphocytic leukemia and follicular lymphoma during or soon after treatment with fludarabine-rituximab-containing regimens: natural history- or therapy-related complication? *Eur J Haematol* 2002; 68(2): 80–83.
16. Lerner RE, Burns LJ. Transformed lymphoma: an Achilles' heel of non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31(7): 531–537.
17. Lossos IS. Higher-grade transformation of follicular lymphoma – a continuous enigma. *Leukemia* 2005; 19(8): 1331–1333.
18. Risdall R, Hoppe RT, Warnke R. Non-Hodgkin's lymphoma: a study of the evolution of the disease based upon 92 autopsied cases. *Cancer* 1979; 44(2): 529–542.
19. Garvin AJ, Simon RM, Osborne CK et al. An autopsy study of histologic progression in non-Hodgkin's lymphomas. 192 cases from the National Cancer Institute. *Cancer* 1983; 52(3): 393–398.
20. Gine E, Lopez-Guillermo A, Montoto S et al. FLIPI and histological subtype are the most important predicting factors of histological transformation in follicular lymphoma. *Ann Oncol* 2005; 16: 106a (Abstr.).
21. Montoto S, Davies AJ, Matthews J et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma (FL) to diffuse large cell B-cell lymphoma (tFL). *Blood* 2005; 106: 602a (Abstr.).
22. Foran JM, Apostolidis J, Papamichael D et al. High-dose therapy with autologous haematopoietic support in patients with transformed follicular lymphoma: a study of 27 patients from a single centre. *Ann Oncol* 1998; 9(8): 865–869.
23. Williams CD, Harrison CN, Lister TA et al. European Bone Marrow Transplant Lymphoma Working Party. High-dose therapy and autologous stem-cell support for chemosensitive transformed low-grade follicular non-Hodgkin's lymphoma: a case-matched study from the European Bone Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* 2001; 19(3): 727–735.
24. Chen CI, Crump M, Tsang R et al. Autotransplants for histologically transformed follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 2001; 113(1): 202–208.
25. Berglund A, Enblad G, Carlson K et al. Long-term follow-up of autologous stem-cell transplantation for follicular and transformed follicular lymphoma. *Eur J Haematol* 2000; 65(1): 17–22.
26. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Mod Pathol* 2000; 13(2): 193–207.
27. Montoto S, Lopez-Guillermo A, Ferrer A et al. Survival after progression in patients with follicular lymphoma: analysis of prognostic factors. *Ann Oncol* 2002; 13(4): 523–530.
28. Montoto S, Lopez-Guillermo A, Altes A et al. Predictive value of Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) in patients with follicular lymphoma at first progression. *Ann Oncol* 2004; 15(10): 1484–1489.
29. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004; 104(5): 1258–1265.
30. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329(14): 987–994.
31. Federico M, Vitolo U, Zinzani PL et al. Prognosis of follicular lymphoma: a predictive model based on a retrospective analysis of 987 cases. *Intergruppo Italiano Linfomi. Blood* 2000; 95(3): 783–789.
32. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 1999; 17(4): 1244. (Erratum in: *J Clin Oncol* 2000; 18(11): 2351.)
33. Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457–481.
34. Peto R, Pike MC. Conservatism of the approximation  $\sigma(0-E)2-E$  in the log-rank test for survival data or tumor incidence data. *Biometrics* 1973; 29(3): 579–584.
35. Cox DR. Regression models and life tables. *J Roy Stat Assoc* 1972; 34: 187–220.
36. Al-tourah A, Chhanabhai M, Gill K et al. Incidence, predictive factors and outcome of transformed lymphoma: a population-based study from British Columbia. *Ann Oncol* 2005; 16: 64a (Abstr.).



## Segon treball

### Resum

Històricament en la LLC s'han reconegut patrons histològics amb una elevada proliferació diferents del que correspondria a una transformació histològica d'una LLC a un LDCG. No obstant, aquests patrons han estat escassament caracteritzats i tot i que habitualment es denominen amb el terme LLC "accelerada", fins al moment actual no s'han establert els criteris histològics per definir-los. A més, tant la base biològica com el significat clínic d'aquests patrons histològics són completament desconeguts. El principal objectiu del treball ha estat definir els criteris histològics que permeten identificar la leucèmia limfàtica crònica "accelerada", a més d'estudiar la correlació clínic-biològica i el pronòstic d'aquests casos en una sèrie àmplia de pacients.

Es van emprar les biòpsies de teixit de 100 pacients amb LLC per tal d'analitzar la mida dels centres de proliferació i l'índex de proliferació, mesurat mitjançant el recompte de mitosis i la tinció de Ki-67. El principal motiu per l'obtenció de les biòpsies en aquesta sèrie de pacients fou descartar la transformació histològica. La mitjana de temps des dels diagnòstic de la LLC fins a l'obtenció de la biòpsia tissular fou de 14 mesos (0 a 204 mesos). La biòpsia tissular objectivà transformació histològica a un LDCG en 22 casos en tant que en els 78 casos restants fou compatible amb una infiltració per LLC. En aquests darrers 78 casos, la presència de centres de proliferació (CP) expandits (majors a un camp de 20x) o amb un alta taxa de proliferació ( $>2.4$  mitosis/CP o un  $Ki-67 > 40\%$ /CP) van correlacionar de forma estadísticament significativa amb un pronòstic desfavorable des del moment de la biòpsia. Es definiren com LLC "accelerades" 23 casos caracteritzats per una elevada proliferació, en forma d'uns CP expandits i/o amb un alt índex de proliferació.

Des d'un punt de vista clínic, els casos "accelerats" en comparació als casos "no accelerats" presentaven una xifra de LDH sèrica i una expressió de ZAP-70 més elevades. La mitjana de supervivència des del moment de la biòpsia dels pacients amb LLC "no accelerada", LLC "accelerada" i transformació a LDCG va ser de 76, 34 i 4,3 mesos, respectivament ( $p < 0,001$ ).

Amb els resultats obtinguts d'aquest treball es pot concloure que la presència de CP expandits i/o amb una elevada proliferació identifiquen a un grup de pacients amb LLC "accelerada" que es caracteritzen per un curs clínic agressiu.



## Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia (“accelerated” chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior

by Eva Giné, Antonio Martinez, Neus Villamor, Armando Lopez-Guillermo, Mireia Camos, Daniel Martinez, Jordi Esteve, Xavier Calvo, Ana Muntañola, Pau Abrisqueta, Maria Rozman, Ciril Rozman, Francesc Bosch, Elias Campo, and Emili Montserrat

*Haematologica* 2010 [Epub ahead of print]

Citation: Giné E, Martinez A, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Camos M, Martinez D, Esteve J, Calvo X, Muntañola A, Abrisqueta P, Rozman M, Rozman C, Bosch F, Campo E, and Montserrat E. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia (“accelerated” chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica*. 2010; 96:xxx  
doi:10.3324/haematol.2010.022277

### *Publisher's Disclaimer.*

*E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.*

Haematologica (pISSN: 0390-6078, eISSN: 1592-8721, NLM ID: 0417435, www.haematologica.org) publishes peer-reviewed papers across all areas of experimental and clinical hematology. The journal is owned by the Ferrata Storti Foundation, a non-profit organization, and serves the scientific community with strict adherence to the principles of open access publishing (www.doaj.org). In addition, the journal makes every paper published immediately available in PubMed Central (PMC), the US National Institutes of Health (NIH) free digital archive of biomedical and life sciences journal literature.

Support Haematologica and Open Access Publishing by becoming a member of the European Hematology Association (EHA) and enjoying the benefits of this membership, which include free participation in the online CME program



## GINE, EVA (ICMHO)

---

**De:** BOSCH, FRANCESC (ICMHO)  
**Enviado el:** martes, 16 de marzo de 2010 10:25  
**Para:** GINE, EVA (ICMHO)  
**Asunto:** RV: HAEMATOL/2010/022277 -- Manuscript Decision

-----Missatge original-----

De: office@haematologica.org [mailto:office@haematologica.org] Enviat el: dt.  
16/03/2010 9:42 Per a: BOSCH, FRANCESC (ICMHO)  
A/c: Mario Cazzola  
Tema: HAEMATOL/2010/022277 -- Manuscript Decision

Dear Dr. Bosch:

Re: Manuscript no. HAEMATOL/2010/022277

We are pleased to inform you that your paper entitled "Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior" has been provisionally accepted for publication in Haematologica, the Official Organ of the European Hematology Association.

Our production office will now prepare a PDF of your unedited paper and will contact you soon to obtain your approval for E-publishing of this PDF ahead of print. Next, your paper will appear in PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)) as an early release version, marked as: [Epub ahead of print].

Your manuscript will then undergo technical editing, and you will hear from the ad hoc Editor if any additional information or clarification is required. Please note that your manuscript might be modified during the editing process: Haematologica has a broad readership, and we want to make sure that your paper is comprehensible to readers outside the specific field. Should your article exceed the page limit, you may be invited to omit parts of your manuscript, which might be published online exclusively as a supplementary appendix. You will have the opportunity of approving or discussing any changes made by the ad hoc Editor by examining your galley proofs. Following proof correction, your paper will appear in one of the regular issues of the journal, both online ([www.haematologica.org](http://www.haematologica.org)) and in print.

Haematologica is an Open Access Publication, and in addition makes every paper published immediately available in PubMed Central (PMC, [www.pubmedcentral.nih.gov](http://www.pubmedcentral.nih.gov)), the US National Institutes of Health (NIH) free digital archive of biomedical and life sciences journal literature. These initiatives are made possible by the vision and support of the Ferrata Storti Foundation and the European Hematology Association.

Open access will ensure a wide circulation of your work in the scientific community, and will create the foundation for future progress in science and medicine.

Thank you very much for choosing to submit your paper to Haematologica.

Sincerely,

Mario Cazzola, MD  
Editor-in-Chief

**Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia (“accelerated” chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior**

Running title: *Accelerated CLL*

Eva Giné,<sup>1</sup> Antoni Martínez,<sup>2</sup> Neus Villamor,<sup>2</sup> Armando López-Guillermo,<sup>1</sup>

Mireia Camos,<sup>2</sup> Daniel Martínez,<sup>2</sup> Jordi Esteve,<sup>1</sup> Xavier Calvo,<sup>1</sup> Ana Muntañola,<sup>1</sup>

Pau Abrisqueta,<sup>1</sup> Maria Rozman,<sup>2</sup> Ciril Rozman,<sup>1</sup> Francesc Bosch,<sup>1</sup>

Elias Campo,<sup>2</sup> and Emili Montserrat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hematology Department, Institute of Hematology and Oncology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain, and <sup>2</sup>Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

**Correspondence**

Francesc Bosch, MD, Department of Hematology, Hospital Clínic Villarroel nº 170, 08036-Barcelona, Spain. Phone: international +34.93.2275475.

Fax: international 34.93.2275484. E-mail: [fbosch@clinic.ub.es](mailto:fbosch@clinic.ub.es)

**Funding**

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Health, FIS-PI07/0409, PI08/0095, Pi08/0304, RT06/0020/002051, 2009-SGR-1008, CICYT SAF 2008-03630 and by the RTICC (Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, RD06/0020/0051).

Current address of F. Bosch and P. Abrisqueta: *Department of Hematology, University Hospital Vall d'Hebron, P. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Current address of M. Camos: Diagnòstic de Laboratori, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950, Esplugues de Llobregat, Spain. Current address of A. Muntañola: Department of Hematology, Hospital Mútua de Terrassa, Dr. Robert 5, 08221 Terrassa, Spain.*

Key words: accelerated chronic lymphocytic leukemia, lymph node biopsy, ZAP-70,

## **Background**

The concept of “accelerated” chronic lymphocytic leukemia (CLL) is frequently used by both pathologists and clinicians. However, neither histological criteria to define this form of CLL nor its clinical correlates and prognostic impact have been formally defined in large series of patients.

## **Design and Methods**

Tissue biopsies from 100 patients with CLL were analyzed for the size of proliferation centers (PCs) and their proliferation rate as assessed by mitosis count and Ki-67 immunostaining. Histological patterns were correlated with main clinico-biological features and outcome.

## **Results**

The suspicion of disease transformation was the main reason to carry out tissue biopsy, which was performed at a median time of 14 months (range, 0 to 204) from CLL diagnosis. The biopsy showed histological transformation to diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL-t) in 22 cases. In the remaining 78 patients, the presence of expanded PCs (broader than a 20x field) and high proliferation rate (either  $>2.4$  mitosis/PC or  $\text{Ki-67} > 40\%$ /PC) predicted poor outcome and were selected to define a highly proliferative group. Thus, 23 patients with either expanded PCs or high proliferation rate were considered as having “accelerated” CLL. These patients displayed particular features, including higher serum LDH levels and more frequently elevated ZAP-70 than “non-accelerated” cases. Median survival from biopsy of patients with “non-accelerated” CLL, “accelerated” CLL and DLBCL-t was 76, 34, and 4.3 months, respectively ( $p < 0.001$ ).

## **Conclusions**

The presence of expanded PCs and/or highly active PCs identifies a group of patients with “accelerated” CLL characterized by an aggressive clinical behavior.

## Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most frequent form of leukemia in Western countries and is considered to be mainly due to the accumulation of neoplastic CD5+ B lymphocytes with a typical CD19+, CD23+ immunophenotype.<sup>1,2</sup> According to the WHO classification<sup>3</sup> CLL and small lymphocytic lymphoma (SLL) are considered to be the same disease, primarily involving peripheral blood in the case of CLL and lymph nodes in SLL. A number of parameters, particularly disease stage, lymphocyte doubling time, IGVH mutational status, ZAP-70 expression and cytogenetics allow to establish the prognosis of the disease at diagnosis.<sup>2,4-6</sup> Over the course of the disease, refractoriness to treatment has poor prognosis. Likewise, disease transformation implies a very short survival.

Although considered as a cumulative rather than a proliferative CD5+ B cell neoplasm, CLL cells have a proliferation rate higher than previously recognized, particularly in the lymphoid tissues.<sup>1,7</sup> Enlarged nodes from patients with CLL show effacement of the lymphoid architecture with a pseudofollicular pattern of pale areas in a dark background of small cells. These pale areas correspond to proliferation centers (PCs)<sup>7-10</sup> and are predominantly composed of clusters of prolymphocytes and paraimmunoblasts. PCs contain numerous T cells, most of them CD4+, and in some cases a fine network of dendritic cells.<sup>11</sup> Notably, as compared to the non-PC component CLL, cells clustered into the PCs have an increased expression of proliferation associated markers Ki-67 and CD71, co-expression of survivin and bcl-2 and also a higher expression of CD20, CD23, and MUM1/IRF-4.<sup>11-18</sup>

Histology of the lymph nodes in CLL is heterogeneous and the relationship between different histologic patterns and clinical outcome has been poorly studied.<sup>8-10,12,18-20</sup> The main reason for this fact is that tissue biopsy is not a standard procedure in the diagnostic workup of patients with CLL. The commonest reason for performing a biopsy is to rule out histological transformation. In general, two major histological patterns in lymph nodes of patients with CLL are recognized: typical CLL involvement and transformation of CLL to DLBCL. However, the existence of no clear-cut histopathological patterns not pertaining into these two broad categories has been known for

many years,<sup>10</sup> being poorly characterized and belonging to a kind of “grey-zone” in the histopathology of CLL. Although the term “accelerated” CLL is frequently used to describe most of these cases, no histological criteria for identifying this form have been yet proposed and its biological background and clinical significance is largely unknown. In the present study we report criteria to identify “accelerated” CLL, its clinical correlates and prognostic impact.

## **Design and Methods**

### ***Patients and samples***

From January 1990 to December 2008, 146 patients fulfilling the diagnostic criteria of CLL according to NCI-WG guidelines<sup>21,22</sup> underwent a tissue biopsy (except bone marrow). These cases represented 24% of the 616 patients diagnosed with CLL during this period in our institution. One-hundred patients with biopsies available for pathological review were the basis of this study. Forty-six patients were not included in the study due to different reasons including a small size of the biopsy precluding a histological review or immunohistological analysis (31 cases); incidental diagnosis of CLL in patients with solid tumors, 3 cases; composite lymphomas, 3 cases; transformation to prolymphocytic leukemia, 2 cases; T-cell lymphomas, 2 cases; and Hodgkin's lymphoma, 5 cases. The tissue analyzed was lymph node in 89 cases, spleen in 1, Waldeyer's ring in 1 and different extranodal tissues in 9.

From each patient the following biological and clinical data were evaluated and recorded both at diagnosis and at the time of the tissue biopsy: age, gender, performance status (according to the Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] scale), presence of B-symptoms, presence of splenomegaly or hepatomegaly, extranodal involvement, hemoglobin, WBC count, lymphocyte count, lymphocyte doubling time, platelet count, serum albumin, LDH, and  $\beta$ 2-microglobulin levels, Rai's and Binet's staging systems, degree of lymphocytic bone marrow infiltration, ZAP-70 and CD38 expression, IGVH mutational status and fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis for recurrent genetic abnormalities in CLL. Moreover, treatment-related variables (type of treatment

and response to therapy) and the M.D. Anderson score for Richter's syndrome<sup>23</sup> were also recorded and evaluated.

FISH studies were performed in peripheral blood lymphocytes by the LSI p53/LSI ATM and LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12 Multicolor Probe Sets provided by Vysis (Downers Grove, IL, USA) using defined cut-off levels.<sup>5</sup> ZAP-70 expression was assessed in peripheral blood samples by flow cytometry (n=42 cases) or by immunostaining in lymph nodes (23 cases) as previously described, with a 95% of concordance between both methods.<sup>4,24</sup> CD38 expression was analyzed by flow cytometry in peripheral blood and considered as increased when equal or superior to 30%. The mutational status of the IGHV genes was analyzed in 27 cases following protocols described elsewhere.<sup>4</sup> Clonality was assessed by studying immunoglobulin heavy chain gene (IgH) rearrangement from peripheral blood and paraffine-embedded tissue samples following BIOMED-2 protocols in 12 patients.<sup>25</sup>

### ***Histological analysis***

Tissue samples were analyzed for the presence and size of PCs, and for the proliferation status as assessed by the mitotic index and Ki-67 immunostaining. Histological review was performed by three investigators (A.M., D.M., E.C.) blinded to clinical records. The samples were examined in a BX51 Olympus microscope (Olympus Tokyo, Japan) with an 20X objective Plan CN20x/0.40 and an ocular WHN 10x/22. Immunostaining was performed in formalin fixed paraffin embedded tissue sections with p27 (1B4, Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK), Ki-67 (Mib1, Dako, Glostrup, Denmark), and p53 (DO7, Dako) in an automated immunostainer (BondMax, Vision BioSystems, Mount Waverley, Australia).

PCs were defined as the pale areas containing large cells, prolymphocytes and paraimmunoblasts, surrounded by a dark background of small lymphocytes. PCs were also identified and delineated by a p27 negative staining.<sup>26</sup> PCs were arbitrarily considered as expanded when two or more PCs exceeded a 20x power field in any of its major dimensions which is approximately equivalent to an area of 0.95 mm<sup>2</sup> in the microscope used to evaluate the samples.

Proliferation inside PCs was determined by both mitotic count and Ki-67 immunostaining and quantified in a total of 8 to 10 PCs per case. In addition, global Ki-67 and p53 were quantified in 8 to 10 40x high power field (*hpf*) randomly selected in the whole tissue section that included both PCs and small cell component areas. The threshold to consider a p53 staining as positive was 30%.

The diagnosis of transformation to diffuse large cell lymphoma was based on the WHO 2008 criteria.<sup>3</sup> In addition, Ki-67 and p53 immunostainings were performed in these cases and separately analyzed.

### ***Statistical analysis***

The correlation between different clinical and biological variables and the histological pattern was performed by means of the Fisher's exact test or nonparametric tests when necessary.

Parameters obtained in the histological analysis, namely the size of PCs and the proliferation index, were correlated with patients survival. To select the optimal cut-off of the quantitative histological variables (mitotic index and Ki-67 expression) for predicting survival, a maximally selected rank statistics test was performed using the Maxstat package (R statistical package, v. 2.8.1, Vienna, Austria)<sup>27</sup> and the cut-off was ultimately delimited by the Kaplan and Meier method.<sup>28</sup> To minimize a possible selection bias, survival was calculated from the time of biopsy and analyzed according to the method described by Kaplan and Meier and the curves compared by the log-rank test.<sup>29</sup> All prognostic variables in the univariate analysis with enough number of cases available were included in the multivariate analysis using the stepwise proportional hazard Cox regression model.<sup>30</sup> All statistical tests were two-sided and the significance level was 0.05.



## Results

### *Patients and tissue biopsies*

The main initial clinico-biological characteristics of the patients are detailed in Table 1. Median age at diagnosis was 59 years-old. Forty-six per cent of patients were in Binet stage B or C and 10% in Rai stage III-IV. The proportion of patients with increased ZAP-70 ( $\geq 20\%$ ) and CD38 ( $\geq 30\%$ ) expression was 67% and 74%, respectively. Forty-four patients were treated immediately after diagnosis and 50 additional cases required treatment during evolution with an overall median time to progression of 5 months (range, 0 to 112 months).

The reason for performing a tissue biopsy in 73 patients was the clinical suspicion of transformation to aggressive lymphoma (i.e. general symptoms, rapid lymph node enlargement, bulky extranodal involvement or increasing serum LDH levels). Other reasons for carrying out a biopsy were the diagnostic workup of a lymphoproliferative disorder without overt peripheral blood involvement (12 patients); re-assessment of the disease before treatment (9 cases); and biopsies routinely obtained in surgical procedures (6 cases). Median time from diagnosis to biopsy was 14 months (range, 0 to 204 months) and median survival from the time of tissue biopsy was 49 months (95% CI: 24 to 74). Clinical features and outcome of patients with CLL without biopsy (median OS, 154 months) were more favorable than those with biopsy (median OS, 90 months) (detailed data not shown).

### *Impact of expanded and proliferating PCs in the patients' outcome*

From the 100 patients included in this series, the diagnosis of CLL was established in 78 cases, whereas the remaining 22 patients were diagnosed with transformation into DLBCL (DLBCL-t).

In the 78 cases included in this study not showing disease transformation to DLBCL, PCs were observed in 69 and were absent in 9. In the latter, isolated prolymphocytes and paraimmunoblasts could be recognized at high magnification and corresponded to the diffuse CLL pattern described by K. Lennert.<sup>10,31</sup> These cases (n=9) did not exhibit other particular histological or clinical features.

Overall, 22 cases (28%) showed expanded and confluent PCs broader than a 20x field. The median number of mitosis per PC was 0.9 (range, 0 to 12 mitosis) and median Ki-67 proliferation index per PC was 10% (range, 0 to 75%). Median Ki-67 in the whole tissue section was 2% (range, 0 to 30%). In addition, p53 positive immunostaining was observed in 5% of the samples.

The following histological features were analyzed for survival: presence of two or more expanded and confluent PCs, mitotic index and Ki-67 expression inside PCs and global Ki-67 expression. Patients with expanded and confluent PCs broader than a 20x field (n=22) had a shorter survival than those with small or absent PCs (Hazard ratio [HR] 2.72, 95% CI HR 1.47 – 5.04;  $p=0.001$ ) (Figure 1A). Moreover, patients with a mitotic index  $>2.4$  (n=14) had a shorter survival than patients with  $\leq 2.4$  mitosis (HR 2.31, 95% CI HR 1.1 – 4.5;  $p=0.016$ ) (Figure 1B). In addition, patients with Ki-67 expression inside PCs  $\leq 40\%$  lived longer than patients with a Ki-67  $>40\%$  (n=6) (HR 3.36, 95%CI 1.27-8.87;  $p=0.014$ ) (Figure 1C). Global Ki-67 expression analysis did not yield any significant cut-off for survival. Among patients with expanded PCs, 65% had either a mitotic rate  $>2.4$  or Ki67  $>40\%$  within the PCs.

Patients with any of the histological parameters with adverse prognosis, namely expanded PCs, mitosis count  $> 2.4$  or Ki67  $>40\%$  per PC, were considered as having an “accelerated” CLL (n=23). The remaining patients with no adverse histological features were considered as having a “non-accelerated” CLL (n=55). The main histological features of patients with “non-accelerated” CLL, “accelerated” CLL, and DLBCL-t are summarized in Table 2. Representative histological images are shown in Figure 2. Among other histological variables studied, the global Ki-67 immunostaining was higher in DLBCL-t than in “accelerated” CLL and “non-accelerated” CLL (mean $\pm$  SD of Ki-67: 68% $\pm$ 14 vs. 12% $\pm$ 8.5 vs. 2% $\pm$ 2.4, respectively;  $p= 0.001$ ). In addition, p53 was positive by immunostaining in 67%, 18% and 2% of patients with DLBCL-t, “accelerated” CLL and “non-accelerated” CLL, respectively ( $p<0.0001$ ).

### ***Analysis of clonality***

To ascertain whether tissue samples of “accelerated” CLL were clonally related to the CLL neoplastic lymphocytes from peripheral blood, IGVH rearrangement was analyzed in 8 patients. The same kind of analysis was also performed in 4 patients with DLBCL-t. All patients with “accelerated” CLL showed the same clonal rearrangement in tissue and peripheral blood. In contrast, one out of four DLBCL-t was clonally unrelated.

### ***Clinico-biological features and outcome of “accelerated” CLL***

The main characteristics of the patients at the time of tissue biopsy are listed in Table 3. Patients with “accelerated” CLL presented similar characteristics compared to the “non-accelerated” CLL cases regarding the presence of B symptoms, performance status, bulky disease or clinical stage. However, patients with “accelerated” CLL had higher serum LDH levels and more elevated ZAP-70 expression ( $p < 0.01$ ), than patients with “non-accelerated” CLL.

On the other hand, patients with DLBCL-t displayed more frequently poor performance status and B symptoms than “accelerated” and “non-accelerated” CLL. It is of note that in 9 out of 22 cases (41%) with DLBCL-t, disease transformation was diagnosed in an extranodal site in contrast to patients with CLL (either “accelerated” or “non-accelerated”), in whom only one extranodal case (breast mass) was observed ( $p < 0.001$ ). Serum LDH levels were found progressively increased from “non-accelerated” CLL, “accelerated” CLL and DLBCL-t (mean values  $\pm$  SD in IU/L:  $455 \pm 194$  vs.  $543 \pm 198$  vs.  $820 \pm 538$ , respectively,  $p = 0.008$ ). Among the three histological groups, no differences in the distribution of poor risk cytogenetic alterations (17p and 11q deletions) were observed.

Time from diagnosis to tissue biopsy was longer in DLBCL-t than in CLL (mean: 69 vs. 45 months, respectively,  $p = 0.001$ ). Whilst 9 out of the 23 “accelerated” CLL cases were observed at diagnosis, only 2 out of the 22 DLBCL-t cases were observed at that moment. Forty-five percent of patients with “accelerated” CLL were diagnosed before starting treatment.

In two patients with “accelerated” CLL new tissue biopsies were obtained during follow-up. In one case the pattern of “accelerated” CLL remained stable over time, whereas in the second one a transformation to DLBCL was demonstrated after 5 years.

The presence of expanded or highly proliferative PCs did not influence the treatment decision. Treatment for “accelerated” CLL cases varied over time. Whereas 52% of patients received doxorubicin-containing regimens, 30% of patients were treated with purine analogs alone or in combination. In contrast, 73% of patients diagnosed with DLBCL-t were treated with doxorubicin-containing regimens. Intensification with stem cell transplantation was carried out in 16 patients, including 6 patients with “non-accelerated” CLL, 6 patients with “accelerated” CLL, and 4 patients with DLBCL-t.

After a median follow-up of 63 months (range, 5.5 to 162 months) from tissue biopsy 64 of the 100 patients eventually died. The cause of death was related to the disease in the 18 patients with DLBCL-t who died, in 17/19 “accelerated” cases and in 26/29 of “non-accelerated” CLL. Median survival from the time of tissue biopsy for DLBCL-t, “accelerated” CLL and “non-accelerated” CLL was 4.3, 34 and 76 months, respectively ( $p < 0.001$ ) (Figure 3). In addition, when cases without suspicion of transformation at the moment of biopsy ( $n=27$ ) were excluded from the analysis, median survival was 4.3 months in DLBCL-t ( $n=22$ ), 34 months in “accelerated” CLL ( $n=21$ ) and 49 months in “non-accelerated” CLL ( $n=30$ ) ( $p=0.032$ ).

Other variables that correlated with poor survival at the time of biopsy were: age ( $>60$  yrs.), ECOG performance status ( $\geq 2$ ), Binet’s and Rai’s advanced clinical stage, B symptoms, bulky disease, hemoglobin level ( $<110$  g/L), platelet count ( $<100 \times 10^9$ /L), elevated LDH and beta-2-microglobulin serum levels, high ZAP-70 expression and 17p deletion. The M.D. Anderson score for Richter’s syndrome was also predictive for survival in the whole series and in the DLBCL-t and “accelerated” histological subsets.

In a multivariate survival analysis, the histological subtype (“non accelerated” vs. “accelerated” vs. DLBCL-t) ( $p < 0.001$ ; RR 2.7 and 5.5 for “accelerated” and DLBCL-t vs. “non-accelerated”, respectively) together with age ( $p < 0.001$ ;

RR 1.05) and the M.D. Anderson score for Richter's syndrome (0-1 vs.  $\geq 2$ ;  $p < 0.001$ ; RR 3.9) were the most important prognostic variables in the global series (analysis performed in 94 patients in whom all the data were available). When the same analysis was performed after excluding patients with DLBCL-t, the histological subtype ("non accelerated" vs. "accelerated") ( $p = 0.007$ ; RR 2.5) along with age ( $p = 0.002$ ; RR 1.05) and M.D. Anderson score for Richter's syndrome ( $p = 0.001$ ; RR 3.6) maintained its prognostic importance.

## Discussion

Increasing data suggest that PCs have an important role in the biology of CLL as they constitute its proliferative compartment.<sup>1,7</sup> However, the complexity of PCs microenvironment has not been completely elucidated.<sup>32</sup> In addition, the clinical significance of the number and size of PCs, where proliferation of CLL takes place, remains to be established. Historically, Lennert<sup>10,31</sup> recognized a histological "tumor-forming" type of CLL characterized by an excessive polymphocyte proliferation, resulting in large lighter regions when examined under the microscope. These "tumor-forming" type CLL cases were considered to convey poor prognosis but no clinical studies were performed at that time. Since then, other studies have attempted to correlate histological characteristics of lymph nodes with prognosis but most of these reports are flawed by a number of reasons, including lack of immunophenotypic studies,<sup>8,9,20</sup> limited number of subjects and short follow-up.<sup>12,18,19</sup>

In our series, PCs were found in 88% of the biopsies and their size and proliferation activity were important predictors for survival from the time of biopsy. Thus, patients with either PCs broader than 20x *hpf* or an increased proliferation rate within PCs as assessed by a mitotic count  $> 2.4$  per PC and/or Ki-67 index  $> 40\%$  per PC, have a particularly poor outcome.

From a clinical point of view, the features of "non-accelerated" and "accelerated" CLL patients were comparable except for the observed higher frequency of elevated LDH levels and ZAP-70 expression in "accelerated" cases. While the latter were also clinically undistinguishable from DLBCL-t cases, "accelerated" CLL was observed in around half of the cases early on the

clinical course of the disease, in untreated patients and mainly with nodal involvement. On the contrary, DLBCL-t tended to occur later in the course of the disease, usually in pretreated patients and frequently displaying extranodal involvement. Moreover, survival curves for “accelerated” CLL and DLBCL-t were different, although this difference did not reach statistical significance (34 months vs. 4 months,  $p=0.07$ ).

A predominance of poor prognostic markers was found in our series compared to standard CLL.<sup>33,34</sup> This is not unexpected since the main reason to perform a biopsy was the suspicion of histological transformation. An increasing number of p53 positive cases were found comparing “non-accelerated” CLL to “accelerated” CLL and to DLBCL-t. Although the high frequency of p53 alterations has been extensively recognized in DLBCL transformation,<sup>35,36</sup> the relative small number of cases in the last two subsets precludes to reach any definitive conclusion.

“Accelerated” CLL probably reflects a biological state of tumor CLL cells characterized by a high proliferation resulting into an aggressive form of the disease and, hence, with a poor prognosis.

Data obtained in the present work emphasize the importance of the lymph node biopsy in CLL. As a general recommendation, all patients with suspicion of clinical transformation and/or aggressive clinical behavior (refractoriness to treatment, high cell turnover) should undergo tissue biopsy. Moreover, the identification of accelerated CLL is easy in the clinical practice since it is based in standard laboratory techniques and it should improve the clinical and therapeutic management of patients with CLL. Ideally, these observations should be confirmed by other groups. On the other hand, whether “accelerated” CLL cases should be treated immediately with an intensive treatment, should be addressed in prospective clinical trials.

In conclusion, in this study we present easy-to-apply histological criteria to identify “accelerated” CLL and show that this form of disease is associated with poor prognostic features and short survival. Further studies are needed to clarify the molecular events behind this form of the disease, its boundaries with

disease transformation, and the more appropriate treatment approach for these patients.

***Authorship and Disclosures***

AM, DM and EC performed histological review; EG and XC collected clinical data, NV, MR, MC, JE, AL, AM, PA provided study materials and patients; FB, AL, CR and EG performed statistical analysis; EG, AM, FB, AL and EC designed the study; EG, AL, FB, EC and EM wrote the paper. The authors do not report potential conflicts of interest.

EG and AM contributed equally to this manuscript. FB, EC and EM were the senior authors of the manuscript

**Figure 1.** Survival from the time of tissue biopsy of patients with non-transformed CLL according to the characteristics of proliferation centers (PCs): **(A)** presence of expanded PCs >20x (17 vs. 75 months, PCs >20x vs. PCs ≤20x, respectively;  $p=0.001$ ); **(B)** > 2.4 mitosis per PC (34 vs. 75 months, >2.4 mitosis/PC vs. ≤ 2.4 mitosis/PC, respectively;  $p=0.016$ ); **(C)** >40% Ki-67 positivity per PC (11 vs. 68 months, >40%/PC vs. ≤40%/PC, respectively;  $p=0.014$ ).

**Figure 2. (A-D-G-J):** A representative case of lymph node involvement by CLL. **(A)** At low magnification the tumor shows the typical biphasic growth pattern with dark areas representing the small lymphocytic component and the clear areas corresponding to small proliferation centers (PCs) (hematoxylin-eosin stain, Olympus DP70, X10). **(D)** The PCs are small (lesser than 20x) and contain some large prolymphocytic cells. Scattered mitosis may also be seen (hematoxylin-eosin stain, Olympus DP70, X20). PCs are highlighted by negative staining with p27 **(G)**, and low Ki-67 labelling index **(J)**. **(B-E-H-K):** A representative CLL case with expanded proliferation centers **(B, E)** wider than 20X field. PCs are highlighted by negative staining with p27 **(H)**. The mitotic count as well as the Ki-67 index **(K)** is high. **(C-F-I-L):** Representative sections of DLBCL transformation of a CLL case. **(C)** Partial involvement of the lymph node by a diffuse proliferation (bottom) of large immunoblastic cells **(F)**. p27 is negative in the tumor cells **(I)** that shows a very high proliferative rate **(L)**.

**Figure 3.** Survival from biopsy according to the histological patterns: “non-accelerated” CLL, “accelerated” CLL and DLBCL transformation (median survival 76 months, 34 months and 4.3 months, respectively ( $p<0.001$ )).



Figure 1

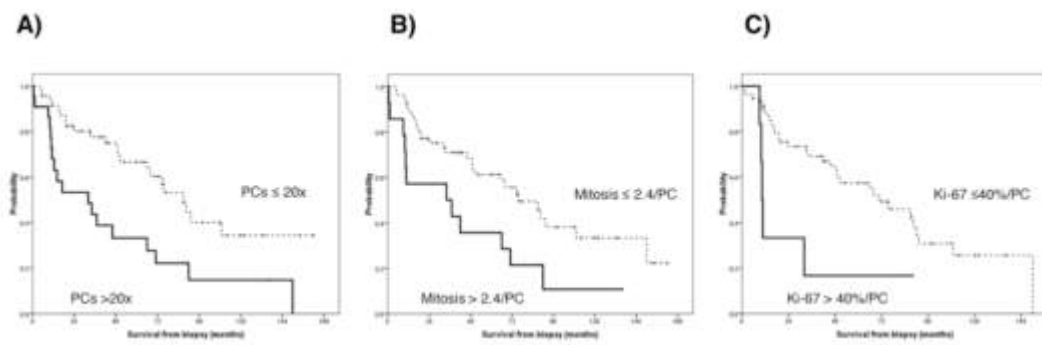


Figure 2

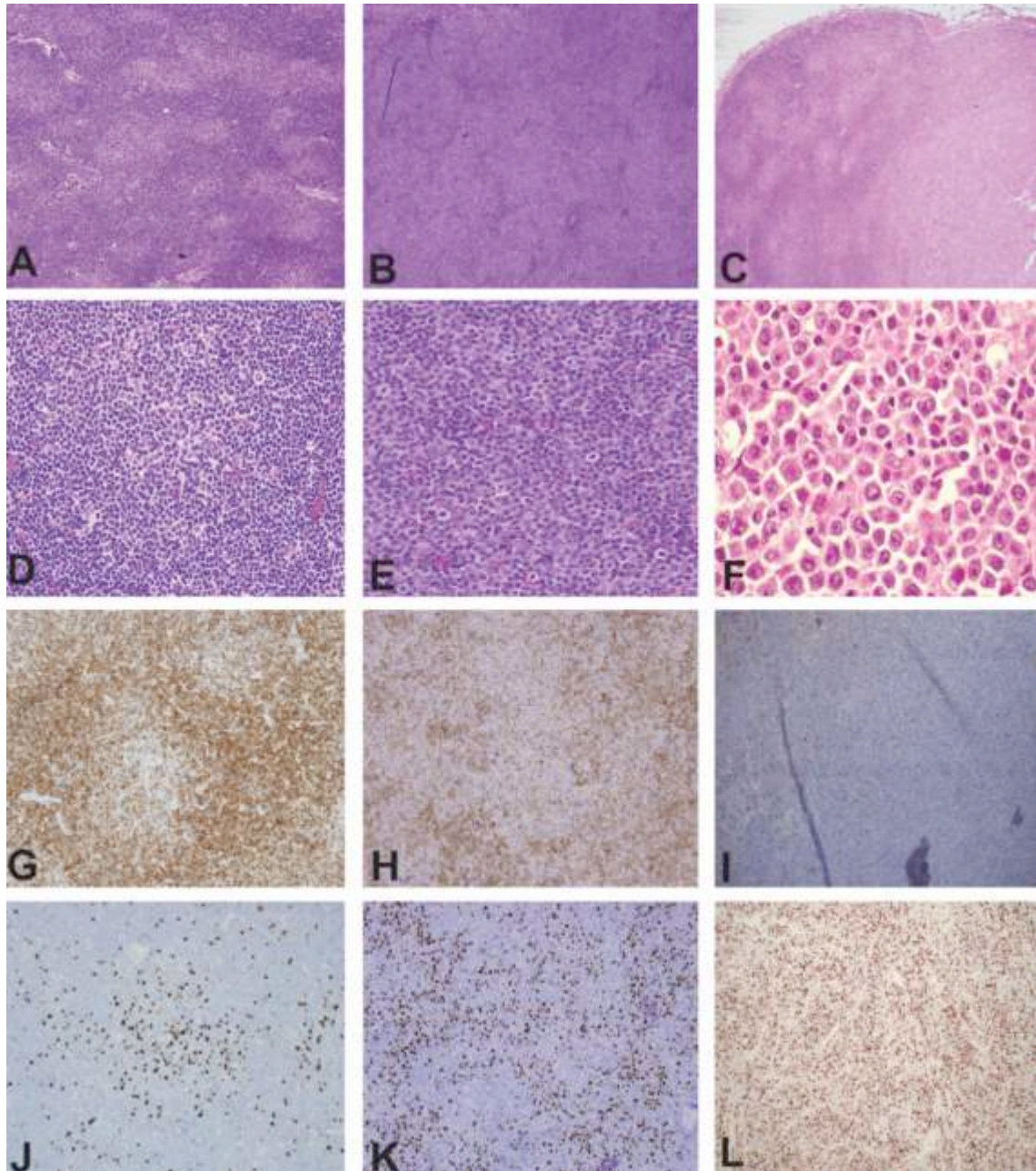
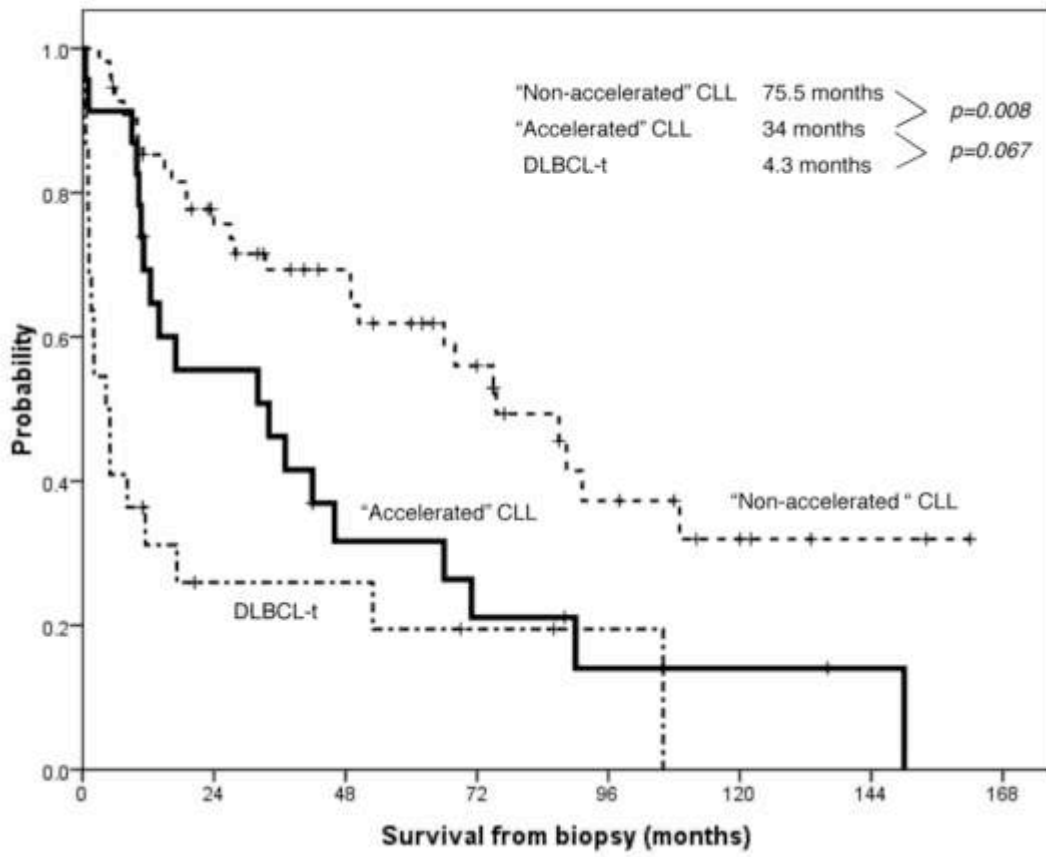


Figure 3



## REFERENCES

1. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;352:804-15.
2. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995;333:1052-7.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
4. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1764-75.
5. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-6.
6. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-54.
7. Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol* 2008;26:4497-03.
8. Ben-Ezra J, Burke JS, Swartz WG, Brownell MD, Brynes RK, Hill LR et al. Small lymphocytic lymphoma: a clinicopathologic analysis of 268 cases. *Blood* 1989;73:579-87.
9. Dick FR, Maca RD. The lymph node in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1978;41:283-92.
10. Lennert K, Mohri N, Stein Hea. Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag; 1978.
11. Schmid C, Isaacson PG. Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology* 1994;24:445-451.
12. Bonato M, Pittaluga S, Tierens A, Criel A, Verhoef G, Wlodarska I et al. Lymph node histology in typical and atypical chronic lymphocytic leukemia. *Am J Surg Pathol* 1998;22:49-56.
13. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002;99:4087-93.
14. Ginaldi L, De MM, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998;51:364-9.

15. Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M et al. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;97:2777-83.
16. Lampert IA, Wotherspoon A, Van NS, Hasserjian RP. High expression of CD23 in the proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia in lymph nodes and spleen. *Hum Pathol* 1999;30:648-54.
17. Soma LA, Craig FE, Swerdlow SH. The proliferation center microenvironment and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Hum Pathol* 2006;37:152-9.
18. Swerdlow SH, Murray LJ, Habeshaw JA, Stansfeld AG. Lymphocytic lymphoma/B-chronic lymphocytic leukaemia--an immunohistopathological study of peripheral B lymphocyte neoplasia. *Br J Cancer* 1984;50:587-99.
19. Asplund SL, McKenna RW, Howard MS, Kroft SH. Immunophenotype does not correlate with lymph node histology in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2002;26:624-9.
20. Morrison WH, Hoppe RT, Weiss LM, Picozzi VJ, Jr., Horning SJ. Small lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol* 1989;7:598-606.
21. 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* 1996;87:4990-7.
22. 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* 2008;111:5446-56.
23. Tsimberidou AM, O'Brien S, Khouri I, Giles FJ, Kantarjian HM, Champlin R et al. Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2006;24:2343-51.
24. Carreras J, Villamor N, Colomo L, Moreno C, Cajal S, Crespo M et al. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J Pathol* 2005;205:507-13.
25. Halldorsdottir AM, Zehnbauser BA, Burack WR. Application of BIOMED-2 clonality assays to formalin-fixed paraffin embedded follicular lymphoma specimens: superior performance of the IGK assays compared to IGH for suboptimal specimens. *Leuk Lymphoma* 2007;48:1338-43.
26. Sanchez-Beato M, Saez AI, Martinez-Montero JC, Sol MM, Sanchez-Verde L, Villuendas R et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 in lymphoid tissue: p27KIP1 expression is inversely proportional to the proliferative index. *Am J Pathol* 1997;151:151-60.
27. Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Computational Statistics & Data Analysis* 2003;43:121-37.

28. Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat assoc* 1958;53:457-81.
29. Peto R, Pike MC. Conservatism of the approximation  $\frac{(O-E)^2}{E}$  in the log-rank test for survival data on tumor incidence data. *Biometrics* 1973;29:759-84.
30. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Assoc* 1972;34:187-220.
31. Lennert K, Soehring M. Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas (Based on the Updated Kiel Classification). 2nd ed. New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1990.
32. Herreros B, Rodriguez-Pinilla SM, Pajares R, Martinez-Gonzalez MA, Ramos R, Munoz I et al. Proliferation centers in chronic lymphocytic leukemia: the niche where NF-kappaB activation takes place. *Leukemia* 2010.
33. Schroers R, Griesinger F, Trumper L, Haase D, Kulle B, Klein-Hitpass L et al. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005;19:750-8.
34. Stilgenbauer S, Krober A, Busch R, Eichhorst B, Kienle D, Winkler D et al. 17p Deletion Predicts for Inferior Overall Survival after Fludarabine - Based First Line Therapy in Chronic Lymphocytic Leukemia: First Analysis of Genetics in the CLL4 Trial of the GCLLSG. *Blood* 2005;106a:715.
35. Bea S, Lopez-Guillermo A, Ribas M, Puig X, Pinyol M, Carrio A et al. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am J Pathol* 2002;161:957-68.
36. Cobo F, Martinez A, Pinyol M, Hernandez L, Gomez M, Bea S et al. Multiple cell cycle regulator alterations in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002;16:1028-34.

**Table 1.** Initial characteristics of 100 patients with CLL.

Parameters	No.
<b>Median age (range)</b>	59 yrs (24-85)
<b>Gender</b>	58M/42 F
<b>ECOG <math>\geq 2</math></b>	6 (6%)
<b>B symptoms</b>	12 (12%)
<b>Bulky disease</b>	7 (7%)
<b>Binet</b>	
A	54 (54%)
B	39 (39%)
C	7 (7%)
<b>Rai</b>	
0	24 (24%)
I-II	66 (66%)
III-IV	10 (10%)
<b>Increased serum LDH*</b>	19 (22%)
<b>Increased <math>\beta 2</math>-microglobulin*</b>	28 (38%)
<b>ZAP-70 (<math>\geq 20\%</math>)*</b>	42 (67%)
<b>CD38 (<math>\geq 30\%</math>)*</b>	45 (74%)
<b>Cytogenetics*</b>	
13q-	16 (43%)
11q-	7 (19%)
17p-	11 (30%)
+12	18 (48%)
<b>IGVH mutational status (UM &gt; 98%)*</b>	23 (85%)
<b>First-line treatment (n=92)</b>	
Alkylators	38 (41%)
Purine analogs	34 (37%)
CHOP regimen	18 (20%)
Others	2 (2%)

M: Male; F: Female. \* Available in 88, 74, 63, 61, 37 and 27 patients, respectively.

**Table 2.** Histological characteristics of “non-accelerated”, “accelerated” CLL and DLBCL-t cases.

Features	“Non-Accelerated” CLL (n=55)	“Accelerated” CLL (n=23)	DLBCL-t (n=22)
<b>Proliferation Centers (PCs)</b>			
Absent	9 (16%)	0	
Small	46 (84%)	1 (4%)	NA
Expanded	0	22 (96%)	
<b>Mitoses/PCs*</b>			
Median (range)	0.4 (0-2.4)	2.5 (1-12)	NA
≤ 2.4	46 (100%)	6 (27%)	
>2.4	0	16 (73%)	
<b>Ki67/PCs (%)†</b>			
Median (range)	5 (0-30)	35 (3-75)	NA
≤ 40%	39 (100%)	16 (73%)	
>40%	0	6 (27%)	
<b>Ki67 global (%)</b>			
Median (range)	1 (0-10)	13 (5-30)	70 (50-90)

DLBCL-t: Diffuse large B cell lymphoma transformation; NA: Not apply; \*evaluable in 69 cases;  
† evaluable in 61 cases



**Table 3.** Main features of patients at biopsy according to histological findings.

Characteristics	“Non-Accelerated” CLL (n=55)	“Accelerated” CLL (n=23)	DLBCL-t (n=22)
Median age (range)	61 yrs (34-85)	59 yrs (34-84)	63 yrs (39-83)
Gender	34M/21 F	11M/12 F	13M/9 F
ECOG $\geq$ 2	8 (17%)	4 (20%)	7 (41%)
B symptoms	11 (22%)	3 (16%)	8 (44%)
Bulky disease	12 (22%)	3 (14%)	5 (28%)
Binet			
A	19 (39%)	7 (35%)	3 (18%)
B	19 (39%)	4 (20%)	6 (35%)
C	11 (22%)	9 (45%)	8 (47%)
Rai			
0*	1 (2%)	-	2 (13%)
I	24 (49%)	6 (30%)	3 (17%)
II	12 (25%)	5 (25%)	3 (17%)
III	6 (12%)	4 (20%)	3 (17%)
IV	6 (12%)	5 (25%)	6 (36%)
Extranodal involvement	1 (0.01)	0 <sup>†</sup>	9 (41%)
LDH (>450 UI/L)	19 (38%)	16 (73%) <sup>†</sup>	12 (71%)
$\beta$ 2-microglobulin (>2.3 mg/dl)	21 (48%)	11 (69%)	7 (70%)
IGVH mutational status (UM> 98%)	10 (77%)	7 (100%)	6 (86%)
ZAP-70 ( $\geq$ 20%)	19 (53%)	16 (89%) <sup>†</sup>	7 (78%)
Prior therapies			
0	39 (74%)	10 (45%) <sup>†</sup>	5 (25%)
1	4 (7%)	5 (23%)	5 (25%)
>1	10 (19%)	7 (32%)	10 (50%)
Resistance to the last treatment ¶	4 (29%)	6 (50%)	5 (33%)

DLBCL-t: Diffuse large B cell lymphoma transformation. \* corresponding to abdominal mass. † % over previously treated patients. Significant  $p$  values for Accelerated vs. Non-Accelerated cases (†): increased serum LDH ( $p=0.01$ ), elevated ZAP-70 ( $p=0.014$ ) and  $\geq 1$  lines of treatment ( $p=0.032$ ). Significant  $p$  value for Accelerated vs. DLBCL-t (†) cases: extranodal involvement ( $p=0.0006$ )



## **IV. DISCUSSIÓ**



## Discussió

Els treballs que integren aquesta tesi han permès aprofundir en el coneixement del fenomen de la transformació histològica en dues de les síndromes limfoproliferatives cròniques més prevalents en la població. Aquest fenomen, ben conegut i estudiat històricament amb les eines disponibles en cada època, ha despertat un renovat interès en la comunitat mèdica i científica, a la llum dels nous avenços tecnològics que han afavorit un millor coneixement dels seus mecanismes biològics. Paral·lelament s'ha constatat la necessitat d'analitzar novament des d'un punt de vista clínic el fenomen de la transformació histològica, tant per redimensionar-lo en base a les noves classificacions histològiques com per ampliar les eines clíniques i biològiques de les que es disposa a l'actualitat per identificar-lo i delimitar-lo de forma més acurada. Els treballs que es presenten en aquesta tesi s'han d'encabir en aquest context. D'una banda, es constata la manca de dades clíniques relatives a la incidència i als factors predictius de la transformació histològica en el LF avaluades en una sèrie amplia de pacients ben caracteritzats amb les eines diagnòstiques actuals. D'una altra banda, es feia pal·lesca la necessitat de reavaluar en la leucèmia limfàtica crònica el significat de la proliferació a nivell histològic donades les implicacions cada cop més rellevants que té aquesta en la biologia de la malaltia i en conseqüència, iniciar l'estudi dels límits entre les formes histològiques de LLC "accelerada" i la transformació histològica.

Aquests dos treballs retrospectius es fonamenten en la disponibilitat de dues grans sèries de pacients amb LF i LLC provinents d'un únic centre. La caracterització d'aquestes síndromes limfoproliferatives així com el maneig clínic, tant pel que fa als protocols diagnòstics, de seguiment i tractament han estat homogenis. En aquests estudis ha estat fonamental la

identificació i revisió histològica dels casos i l'ús d'eines d'estadística per a conformar els resultats.

Un dels factors que resulta més limitant i que afecta a tots aquests tipus d'estudis és que les dades es basen en la subpoblació de pacients en la que s'ha pogut obtenir una biòpsia tissular al llarg del seu seguiment clínic. Diferents aspectes hi influeixen de forma determinant. Els criteris emprats per a indicar una biòpsia tissular, el tipus i durada del seguiment dels pacients i les limitacions pròpies del pacient per edat, afectació de l'estat general, localització de l'afectació o refús al procediment. Per tant, les conclusions que es deriven d'aquests estudis sempre estan condicionades per aquestes limitacions.

En el primer treball que centrà l'estudi en el fenomen de la transformació histològica en el LF varem estimar una incidència del 15% i del 22% als 10 i 15 anys, respectivament, en 276 pacients diagnosticats de LF. Aquestes dades concorden amb les descrites a la literatura en diferents sèries, tot i que són inferiors a les observades en dues sèries més actuals aparegudes posteriorment a la publicació d'aquest primer treball. La primera d'aquestes observà en una sèrie de 325 pacients amb LF un risc de transformació histològica del 28% i 37%, als 10 i 15 anys del diagnòstic, respectivament i del 15% en cada nova progressió clínica del LF.<sup>82</sup> La segona observà una incidència anual de transformació del 3% en 600 pacients amb LF, amb una incidència acumulada del 30% als 10 anys de seguiment.<sup>76</sup> Aquestes diferències en relació al nostre estudi s'explicarien en el primer cas, perquè la proporció de pacients rebiopsiats en les diferents recidives del LF fou superior en l'estudi britànic (un 70% global) front al nostre estudi (un 50% global). En aquest sentit, estudis més antics han demostrat que la proporció de casos transformats augmenta en cada nova progressió o

recaiguda que es biòpsia<sup>80</sup> i de fet, les incidències més altes de transformació histològica provenen d'estudis autòpsics.<sup>79,81,84</sup>

En el segon cas, cal tenir en compte que l'estudi canadenc inclogué dins els casos transformats, pacients amb sospita clínica de transformació però sense evidència citològica o histològica de la mateixa (36% dels casos), tot demostrant que la supervivència d'aquests casos era superponible a la dels que es disposava de biòpsia confirmatòria. Per contra, en el nostre estudi s'havien seguit criteris histològics estrictes per establir el diagnòstic de transformació que inclogueren la revisió de la histologia en tots els casos transformats, tant al diagnòstic com en el moment de la transformació. De forma, que el nostre estudi no inclogué cap dels pacients on es va sospitar clínicament una possible transformació però en els que no es disposava de material citològic o histològic per confirmar-la. Com a conseqüència d'aquest criteri de selecció i de la proporció menor de casos on es disposava de rebiòpsia en la progressió, cal considerar que la incidència que varem observar en el nostre estudi probablement estava infraestimada.

Aquestes discrepàncies posen de manifest novament la dificultat inherent a la necessitat d'obtenir una confirmació histològica per al diagnòstic de la transformació. No obstant, cal tenir en compte que aquest pas és indispensable per tal de realitzar un diagnòstic acurat i per tant, dissenyar la millor estratègia terapèutica possible per al pacient. Tenint en compte a més, la relativa freqüència d'aquesta situació clínica és del tot justificat recomanar l'obtenció rutinària de biòpsies tissulars en cada nova progressió clínica dels pacients amb LF.

Els factors de risc per a la transformació histològica s'havien analitzat principalment en un estudi previ<sup>77</sup> on s'identificaven la presència d'hipoalbuminèmia, l'elevació de la beta-2-microglobulina sèrica i la no



obtenció d'una remissió completa (RC) com paràmetres predisposants per la transformació. Aquest mateix estudi però, no trobà valor pronòstic en l'elevació de la LDH sèrica o el subtipus histològic al diagnòstic del LF. En la nostra sèrie de pacients, les variables al diagnòstic del LF que es van associar a transformació histològica van ser el grau 3 histològic, >4 territoris nodals afectats, LDH i beta-2-microglobulina sèriques elevades, FLIPI i IPI d'alt risc. Probablement les discrepàncies entre aquests dos treballs s'explicarien pel baix percentatge de pacients amb un grau histològic 3 (5%) i pel baix nombre de pacients amb disponibilitat de LDH (67%) en la sèrie de Bastion.<sup>77</sup> A més, en un estudi posterior<sup>82</sup> també es va identificar una tendència a la significació estadística tant per la elevació de la LDH sèrica com per al grau histològic 3.

Cal assenyalar que per una altra banda, el FLIPI junt al grau 3 histològic foren les variables que mantingueren el seu significat pronòstic en l'anàlisi multivariada realitzada en el nostre estudi. És més, un cop exclosos de l'anàlisi els pacients amb grau 3 histològic, únicament el FLIPI correlacionava amb el risc de transformació histològica. La importància del FLIPI com a factor de risc en la transformació histològica s'ha confirmat posteriorment en la sèrie de Montoto.<sup>82</sup> Aquest darrer estudi junt amb l'estudi de Al-Tourah<sup>76</sup> identificaven a més l'estadi clínic avançat com un factor de risc per a la transformació. Malauradament, en aquest darrer treball que és el més important en nombre de pacients no es disposava de les dades corresponents al FLIPI per poder ser inclòs en l'anàlisi.

El conjunt de resultats d'aquests estudis, incloent els que es deriven d'aquest primer treball de tesi doctoral, apunten a la càrrega tumoral en el moment del diagnòstic del LF com el principal factor de risc clínic per a la transformació. En el moment actual, tot i els importants avenços en el coneixement de la biologia de la transformació queda pendent d'identificar i

establir factors de risc biològics que puguin ser d'utilitat pràctica en el maneig dels pacients.

En el moment de la transformació histològica s'observà des d'un punt de vista clínic una important proporció de pacients amb afectació de l'estat general (44%), FLIPI i IPI d'alt risc (41 i 48%, respectivament) i presència d'una LDH (81%) o beta-2-microglobulina elevades (46%). La transformació s'observà de forma precoç en el temps, als 3,5 anys de mitjana des del diagnòstic del LF. Tanmateix, a l'igual que en altres estudis<sup>76</sup> no varem observar la existència de *plateau* per a aquest fenomen, tot observant l'aparició de transformació histològica en alguns casos més enllà dels 10 anys i fins als 20 anys des del diagnòstic del LF. En alguns estudis<sup>77,82</sup> s'ha suggerit que el fenomen de la transformació seria excepcional més enllà dels 15 anys. Aquesta hipòtesi es fonamentaria en l'existència d'algunes dades biològiques que reconeixrien dos subtipus de LF amb una diferent predisposició a la transformació histològica.<sup>77,87</sup> En tot cas, aquesta no és l'experiència del nostre grup.

Les característiques clíniques dels pacients en el moment de la transformació eren en la majoria dels casos desfavorables. Fins un 44% presentaven un estat general afectat ( $\geq 2$ ), un 33% presentaven símptomatologia B, un 22% massa bulky, un 68% un estadi clínic avançat (III-IV) i un 81% elevació de la LDH sèrica. A més un 48% dels pacients presentaven un IPI de risc intermig-alt o alt i fins un 76% dels casos un FLIPI de risc intermig o alt.

El 80% dels pacients transformats van poder rebre un tractament de rescat quimioteràpic intensiu (règims tipus CHOP, VIA i MINE/ESHAP), que inclogué trasplantament autòleg de progenitors hemopoètics en un 25% dels casos. Tot i ésser assolida la remissió completa en un 52% dels pacients tractats, la mitjana de supervivència després de la transformació

va ser de tan sols 1,2 anys. En aquest sentit cal assenyalar que 13 del 16 pacients en resposta després del tractament de rescat van presentar recidiva o progressió en la nostra sèrie. En els casos en que es va poder obtenir una nova biòpsia aquesta fou compatible amb un LDCG o amb un LF. Recentment s'ha demostrat que els pacients amb LF que presenten una transformació histològica presenten tant una supervivència global com una supervivència des de la progressió significativament més escurçades respecte als pacients amb LF on no es demostra transformació histològica.<sup>82</sup>

Els factors que van associar-se en el moment de la transformació a una millor supervivència foren la presència d'un estat general conservat ( $\leq 1$ ), un estadi clínic localitzat (I-II), i un IPI de risc baix o intermedi-baix ( $< 3$ ). Els pacients que van assolir una remissió completa amb el tractament de rescat van presentar una probabilitat de supervivència del 43% als 5 anys de la transformació front la resta de pacients que presentaren una probabilitat de supervivència del 0%. No varem observar diferències en la supervivència entre els pacients que havien rebut un trasplantament autòleg dins el tractament de rescat i aquells que no l'havien rebut. No obstant, cal assenyalar que aquest procediment es va a dur a terme en un nombre molt limitat de pacients i per tant es fa difícil extreure conclusions al respecte.

Sis pacients transformats van presentar supervivències prolongades després de la transformació ( $> 5$  anys). Aquests casos havien assolit una remissió completa amb el tractament de rescat que inclogué un trasplantament autòleg en un únic cas. Aquestes dades assenyalen que tot i que el fenomen de la transformació histològica té en general un impacte pronòstic molt desfavorable pels pacients, continua existint un petit subgrup de pacients que poden beneficiar-se de supervivències molt prolongades.

L'obtenció d'una remissió completa amb el tractament de rescat es fa imprescindible per tal de poder aconseguir una supervivència més prolongada en els pacients transformats.<sup>86</sup> El disseny de noves estratègies de tractament en els pacients transformats, que inclourien l'avaluació de nous fàrmacs en assajos clínics, es fa cada cop més necessària per tal de millorar uns resultats que no s'han vist modificats en dècades.

El segon treball d'aquesta tesi doctoral va tenir com a objectiu avaluar la correlació de la proliferació a nivell tissular amb la supervivència dels pacients amb LLC. Amb aquesta anàlisi es pretenia definir les característiques histopatològiques i clíniques de la LLC "accelerada", que és un concepte que tot i haver estat suggerit en alguns estudis previs, no s'havia definit d'una forma sistemàtica. En base a aquests objectius es va realitzar un estudi retrospectiu en una sèrie de 614 pacients amb LLC diagnosticats i tractats en un únic centre. El criteri de selecció final dels pacients per a l'estudi va ser la disponibilitat d'una biòpsia tissular (diferent a la de moll d'os) que fos compatible amb una LLC o amb una LLC transformada a un LDCG (n= 100 pacients).

El primer aspecte a discutir en aquest estudi és que en general en la LLC les biòpsies tissulars no es requereixen per tal d'establir el diagnòstic de la malaltia. Ara bé, d'acord amb les recomanacions del IWCLL<sup>43,217</sup> aquesta indicació és especialment necessària front una sospita clínica de transformació a un limfoma agressiu. D'aquest fet es desprèn, que el motiu principal per indicar una biòpsia tissular en un pacient amb LLC sigui descartar la transformació histològica, i per tant, els pacients amb LLC en els que es centrà el nostre estudi representaven una població molt seleccionada, amb característiques clínico-biològiques diferents a una població general de pacients amb LLC.

En els darrers anys s'estan acumulant evidències sobre la importància que poden tenir els centres de proliferació (CP) en la biologia de la leucèmia limfàtica crònica.<sup>49,175</sup> No obstant, la significació clínica de les diferents característiques histològiques dels centres de proliferació, els quals constitueixen el compartiment proliferant de la LLC, encara no ha estat establert. Des d'un punt de vista històric, Lennert<sup>69</sup> reconegué un subtipus histològic de LLC, "tumor-forming", caracteritzat per un excés de proliferació que es traduïa a l'examen microscòpic en l'observació d'extenses àrees més pàl·lides a la tinció d'hematoxilina-eosina. Aquest autor hipotetitzà que aquests casos probablement presentaven una cursa clínic més desfavorable comparat als casos amb una histologia difusa o amb petits pseudofol·licles. No obstant, aquesta hipòtesi no va ser ulteriorment avaluada en cap estudi clínic. Posteriorment un nombre limitat d'estudis van provar de correlacionar les característiques histològiques del gangli limfàtic amb un diferent pronòstic dels pacients. Malauradament, tots aquests estudis presenten unes importants limitacions que fan que no hagi estat possible establir unes conclusions definitives al respecte. En aquest sentit, els estudis més antics no utilitzaven criteris fenotípics per tal d'identificar els casos com LLC, i de fet l'anàlisi dels criteris emprats en aquests estudis fa pensar que en molts casos s'incloueren altres malalties diferents a la LLC.<sup>66,68,70</sup> Per contra, els estudis més recents que sí inclouen criteris immunofenotípics, estan limitats pel nombre de pacients o pel seguiment clínic, la qual cosa fa també que sigui impossible establir conclusions fermes sobre la significació pronòstica de la histologia del gangli limfàtic.<sup>65,67,71</sup>

En aquest context varem decidir avaluar la proliferació a nivell de les biòpsies tissulars de LLC mitjançant l'anàlisi de la presència i mida dels CP, i la quantificació de la proliferació mitjançant el nombre de mitosis i la

tinció de Ki-67. Els casos que mostraven una transformació histològica a un LDCG van ser revisats i analitzats de forma separada.

Es van identificar centres de proliferació en el 88% de les biòpsies de LLC analitzades. A banda de la seva identificació habitual amb la tinció d'hematoxilina-eosina es va utilitzar el seu marcatge negatiu per a p27 per a millorar tant la seva identificació com la seva delineació.

Tant la mida dels centres de proliferació com l'activitat proliferant dins d'aquests centres es van correlacionar de forma significativa amb la supervivència dels pacients des del moment de la biòpsia. En aquest sentit, els pacients que presentaven CP expandits (dos o més centres de mida superior a 20x hpf) o un increment de la proliferació dins els CP, amb un nombre de mitosis  $> 2,4/CP$  i/o un Ki-67  $> 40\%$ , tenien un pronòstic desfavorable i es va considerar que presentaven una LLC "accelerada". La supervivència des de la biòpsia dels pacients amb LLC "accelerada" fou més curta que aquells que no presentaven cap característica histològica de mal pronòstic (LLC "no accelerada"), 34 mesos vs. 75.5 mesos, respectivament;  $p = 0.008$ .

Les característiques clínic-biològiques en el moment de la biòpsia per als pacients amb LLC "no accelerada", LLC "accelerada" i els casos amb LLC transformada a LDCG van ser globalment molt similars. Cal destacar però, que els casos amb LLC "accelerada" van presentar de forma estadísticament significativa una més freqüent elevació de la LDH sèrica i expressió elevada de ZAP-70 respecte els casos amb LLC "no accelerada". Des d'un punt de vista clínic, els casos amb LLC "accelerada" van ser clínicament indistingibles dels casos on es va demostrar una transformació histològica a LDCG. Tanmateix, cal assenyalar que les LLC "accelerades" es van observar fins en la meitat dels casos de forma precoç en el curs evolutiu de la malaltia, en pacients que no havien rebut tractament i amb

una afectació exclusivament nodal. Per contra, molts dels casos amb transformació a LDCG es van observar més tardanament en el curs clínic dels pacients, motiu pel qual molts d'aquests havien rebut tractament i freqüentment existia una afectació extranodal en el moment de la transformació. La mitjana de supervivència des del moment de la biòpsia dels casos amb LLC "accelerada" i dels casos transformats a LDCG tot i ser diferent, no va ser estadísticament significativa en el nostre estudi (34 mesos vs. 4 mesos, respectivament,  $p=0,07$ ).

L'estudi immunohistoquímic d'aquesta sèrie de pacients també va permetre observar que la positivitat per a p53 era creixent al comparar LLC "no accelerades", LLC "accelerades" i casos transformats a LDCG. El paper de les alteracions de p53 en la transformació a un LDCG és quelcom ben conegut, ara bé el nombre limitat de casos d'aquesta sèrie no permet establir altres conclusions referents als casos transformats i als casos amb LLC "accelerada".

Els casos amb LLC "accelerada" probablement estan reflectint un estat biològic de la cèl·lula tumoral caracteritzat per una major proliferació, que condiciona un augment de l'agressivitat clínica i per tant un mal pronòstic del pacient.

Les dades obtingudes en el nostre estudi posen de relleu la importància que té l'obtenció d'una biòpsia tissular en la LLC. En general, caldria recomanar obtenir una biòpsia tissular davant la sospita clínica de transformació i/o una clínica agressiva (refractarietat a tractament, alta proliferació tumoral). En definitiva, aquest estudi ha permès definir uns criteris histològics de fàcil aplicació que permeten identificar la LLC "accelerada", una forma de LLC associada a factors de mal pronòstic i a una curta supervivència. Queden per desvetllar a partir d'ara els

mecanismes moleculars que es troben implicats en aquesta forma de malaltia, els seus límits amb la transformació histològica i el tractament més adient per a aquests pacients. A més a més, aquest estudi també és demostratiu de la importància que pot tenir realitzar biòpsies en els pacients amb LLC per millorar el coneixement de la malaltia.





## V. CONCLUSIONS



## Conclusions

1. La transformació histològica és un fenomen que s'observa amb freqüència en els pacients amb LF, 20% als deu anys del diagnòstic en termes actuarials, i que molt probablement se subestima per les dificultats en obtenir una confirmació histològica.
2. La presència d'un grau 3 histològic i d'un FLIPI de mal pronòstic en el moment del diagnòstic del LF s'associen amb un major risc d'aparició d'una transformació histològica.
3. La transformació histològica comporta un pronòstic desfavorable per al pacient, amb una supervivència des del moment de la transformació d'un any aproximadament
4. Els pacients que aconsegueixen assolir una remissió completa amb els tractaments de rescat tenen supervivències més perllongades
5. La LLC "accelerada" pot definir-se des d'un punt de vista histològic per la presència de centres de proliferació expandits (majors a un camp de 20x hpf) o bé per un increment de la proliferació dins dels centres, amb un nombre de mitosis  $> 2,4/CP$  i/o un Ki-67  $> 40\%$ .
6. La LLC "accelerada" és una forma histològica que condiona un pronòstic desfavorable, tot i que el seu impacte en termes de supervivència és menys negatiu que el que té una transformació histològica a un LDCG.

## *Conclusions*

7. Els pacients amb LLC “accelerada” presenten amb més freqüència una elevació de la xifra de LDH sèrica i també una expressió elevada de ZAP-70.
8. En base a aquestes observacions cal resaltar la importància d’obtenir biòpsies ganglionars en els pacients amb LLC, sobretot en aquells amb sospita clínica de transformació histològica.

## VI. BIBLIOGRAFIA



## **Bibliografia**

1. Rappaport H. Tumors of hematopoietic system. Atlas of tumor pathology. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1966.
2. Lennert K, Stein H, Kaiserling E. Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphoma. *Br J Cancer Suppl* 1975;2:29-43.
3. Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 1974;34:suppl-503.
4. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer* 1982;49:2112-35.
5. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC,. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-92.
6. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardimon JWE (Eds). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC:Lyon 2001.
7. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC:Lyon 2008.
8. Jaffe ES, Chan JK, Su IJ, Frizzera G, Mori S, Feller AC, Ho FC. Report of the Workshop on Nasal and Related Extranodal Angiocentric T/Natural Killer Cell Lymphomas. Definitions, differential diagnosis, and epidemiology. *Am J Surg Pathol* 1996;20:103-11.
9. Macon WR, Levy NB, Kurtin PJ, Salhany KE, Elkhalfi MY, Casey TT, Craig FE, Vnencak-Jones CL, Gulley ML, Park JP, Cousar JB. Hepatosplenic alphabeta T-cell lymphomas: a report of 14 cases and comparison with hepatosplenic gammadelta T-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2001;25:285-96.
10. Richter MN. Generalized reticular cell sarcoma of lymph nodes associated with lymphatic leukemia. *Am J Pathol* 1928;4:285-92.



11. Rappaport H, Winter W.J., Hicks EB. Follicular lymphoma: A re-evaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based on a survey of 253 cases. *Cancer* 1956;9:792-821.
12. Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, Ott G, Nathwani BN, de Jong D, Yoshino T, Sappgolo D. Follicular Lymphoma. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC: Lyon 2008; 220-226.
13. Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1995;103:472-8.
14. Hoglund M, Sehn L, Connors JM, Gascoyne RD, Siebert R, Sall T, Mitelman F, Horsman DE. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:195-204.
15. Offit K, Parsa NZ, Gaidano G, Filippa DA, Louie D, Pan D, Jhanwar SC, la-Favera R, Chaganti RS. 6q deletions define distinct clinico-pathologic subsets of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993;82:2157-62.
16. Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, Lenormand B, Bigorgne C, Kunlin A, Monconduit M, Bastard C. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood* 1994;84:1043-9.
17. Johnson PW, Rohatiner AZ, Whelan JS, Price CG, Love S, Lim J, Matthews J, Norton AJ, Amess JA, Lister TA. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol* 1995;13:140-7.
18. Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Bosch F, Terol MJ, Campo E, Rozman C. Applicability of the International Index for aggressive lymphomas to patients with low-grade lymphoma. *J Clin Oncol* 1994;12:1343-8.
19. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, Au WY, Bellei M, Brice P, Caballero D, Coiffier B, Conde-Garcia E, Doyen C, Federico M, Fisher RI, Garcia-Conde JF, Guglielmi C, Hagenbeek A, Haioun C, LeBlanc M, Lister AT, Lopez-Guillermo A, McLaughlin P, Milpied N, Morel P, Mounier N, Proctor SJ, Rohatiner A, Smith P, Soubeyran P, Tilly H, Vitolo U, Zinzani PL, Zucca E, Montserrat E. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004;104:1258-65.

20. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Connors JM, Lansdorp PM, Ouyang Q, Lister TA, Davies AJ, Norton AJ, Muller-Hermelink HK, Ott G, Campo E, Montserrat E, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Yang L, Powell J, Zhao H, Goldschmidt N, Chiorazzi M, Staudt LM. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 2004;351:2159-69.
21. Glas AM, Knoops L, Delahaye L, Kersten MJ, Kibbelaar RE, Wessels LA, van LR, van Krieken JH, Baars JW, Raemaekers J, Kluin PM, Van't Veer LJ, de JD. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25:390-8.
22. Voorhees PM, Carder KA, Smith SV, Ayscue LH, Rao KW, Dunphy CH. Follicular lymphoma with a burkitt translocation--predictor of an aggressive clinical course: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:210-3.
23. Seymour JF, Pro B, Fuller LM, Manning JT, Hagemeister FB, Romaguera J, Rodriguez MA, Ha CS, Smith TL, Ayala A, Hess M, Cox JD, Cabanillas F, McLaughlin P. Long-term follow-up of a prospective study of combined modality therapy for stage I-II indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2003;21:2115-22.
24. Wilder RB, Jones D, Tucker SL, Fuller LM, Ha CS, McLaughlin P, Hess MA, Cabanillas F, Cox JD. Long-term results with radiotherapy for Stage I-II follicular lymphomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:1219-27.
25. Solal-Celigny P, Lepage E, Brousse N, Tendler CL, Brice P, Haioun C, Gabarre J, Pignon B, Tertian G, Bouabdallah R, Rossi JF, Doyen C, Coiffier B. Doxorubicin-containing regimen with or without interferon alfa-2b for advanced follicular lymphomas: final analysis of survival and toxicity in the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires 86 Trial. *J Clin Oncol* 1998;16:2332-8.
26. Czuczman MS, Weaver R, Alkuzweny B, Berfein J, Grillo-Lopez AJ. Prolonged clinical and molecular remission in patients with low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma treated with rituximab plus CHOP chemotherapy: 9-year follow-up. *J Clin Oncol* 2004;22:4711-6.

27. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, Reiser M, Metzner B, Harder H, Hegewisch-Becker S, Fischer T, Kropff M, Reis HE, Freund M, Wormann B, Fuchs R, Planker M, Schimke J, Eimermacher H, Trumper L, Aldaoud A, Parwaresch R, Unterhalt M. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2005;106:3725-32.
28. Marcus R, Imrie K, Belch A, Cunningham D, Flores E, Catalano J, Solal-Celigny P, Offner F, Walewski J, Raposo J, Jack A, Smith P. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 2005;105:1417-23.
29. Mann RB, Berard CW. Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphomas: a proposed alternative method. *Hematol Oncol* 1983;1:187-92.
30. Metter GE, Nathwani BN, Burke JS, Winberg CD, Mann RB, Barcos M, Kjeldsberg CR, Whitcomb CC, Dixon DO, Miller TP. Morphological subclassification of follicular lymphoma: variability of diagnoses among hematopathologists, a collaborative study between the Repository Center and Pathology Panel for Lymphoma Clinical Studies. *J Clin Oncol* 1985;3:25-38.
31. Bartlett NL, Rizeq M, Dorfman RF, Halpern J, Horning SJ. Follicular large-cell lymphoma: intermediate or low grade? *J Clin Oncol* 1994;12:1349-57.
32. Kantarjian HM, McLaughlin P, Fuller LM, Dixon DO, Osborne BM, Cabanillas FF. Follicular large cell lymphoma: analysis and prognostic factors in 62 patients. *J Clin Oncol* 1984;2:811-9.
33. Martin AR, Weisenburger DD, Chan WC, Ruby EI, Anderson JR, Vose JM, Bierman PJ, Bast MA, Daley DT, Armitage JO. Prognostic value of cellular proliferation and histologic grade in follicular lymphoma. *Blood* 1995;85:3671-8.
34. Rodriguez J, McLaughlin P, Fayad L, Santiago M, Hess M, Rodriguez MA, Romaguera J, Hagemester F, Kantarjian H, Cabanillas F. Follicular large cell lymphoma: long-term follow-up of 62 patients treated between 1973-1981. *Ann Oncol* 2000;11:1551-6.
35. Wendum D, Sebban C, Gaulard P, Coiffier B, Tilly H, Cazals D, Boehn A, Casasnovas RO, Bouabdallah R, Jaubert J, Ferrant A, Diebold J, de MA, Gisselbrecht C. Follicular large-cell lymphoma treated with intensive chemotherapy: an analysis of 89 cases included in the LNH87 trial and comparison with the outcome of diffuse large B-cell lymphoma. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol* 1997;15:1654-63.

36. Wang SA, Wang L, Hochberg EP, Muzikansky A, Harris NL, Hasserjian RP. Low histologic grade follicular lymphoma with high proliferation index: morphologic and clinical features. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1490-6.
37. Bosga-Bouwer AG, van Imhoff GW, Boonstra R, van d, V, Haralambieva E, van den BA, de JB, Krause V, Palmer MC, Coupland R, Kluin PM, van den Berg E, Poppema S. Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. *Blood* 2003;101:1149-54.
38. Bosga-Bouwer AG, van den BA, Haralambieva E, de JD, Boonstra R, Kluin P, van den BE, Poppema S. Molecular, cytogenetic, and immunophenotypic characterization of follicular lymphoma grade 3B; a separate entity or part of the spectrum of diffuse large B-cell lymphoma or follicular lymphoma? *Hum Pathol* 2006;37:528-33.
39. Katzenberger T, Ott G, Klein T, Kalla J, Muller-Hermelink HK, Ott MM. Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *Am J Pathol* 2004;165:481-90.
40. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rudiger T, Wilhelm M, Kalla J, Rosenwald A, Muller JG, Ott MM, Muller-Hermelink HK. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 2002;99:3806-12.
41. Hans CP, Weisenburger DD, Vose JM, Hock LM, Lynch JC, Aoun P, Greiner TC, Chan WC, Bociek RG, Bierman PJ, Armitage JO. A significant diffuse component predicts for inferior survival in grade 3 follicular lymphoma, but cytologic subtypes do not predict survival. *Blood* 2003;101:2363-7.
42. Müller-Hermelink H.K., Montserrat E, Catovsky D, Campo E, Harris NL, Stein H. Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC: Lyon 2008;180-2.
43. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111:5446-56.
44. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-6.

45. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;353:1793-801.
46. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;6:857-66.
47. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Koltz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-7.
48. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-54.
49. Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol* 2008;26:4497-503.
50. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, Belhou L, Stella S, Stavroyianni N, Crespo M, Hadzidimitriou A, Sutton L, Bosch F, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Montserrat E, Fassas A, Dighiero G, Caligaris-Cappio F, Merle-Beral H, Ghia P, Davi F. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007;109:259-70.
51. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639-47.
52. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1764-75.

53. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbès S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
54. Abrisqueta P, Pereira A, Rozman C, Aymerich M, Gine E, Moreno C, Muntanola A, Rozman M, Villamor N, Hodgson K, Campo E, Bosch F, Montserrat E. Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980-2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood* 2009;114:2044-50.
55. Bosch F, Ferrer A, Lopez-Guillermo A, Gine E, Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Cobo F, Perales M, Esteve J, Altes A, Besalduch J, Ribera JM, Montserrat E. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;119:976-84.
56. Bosch F, Ferrer A, Villamor N, Gonzalez M, Briones J, Gonzalez-Barca E, Abella E, Gardella S, Escoda L, Perez-Ceballos E, Asensi A, Sayas MJ, Font L, Altes A, Muntanola A, Bertazzoni P, Rozman M, Aymerich M, Gine E, Montserrat E. Fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia: high response rate and disease eradication. *Clin Cancer Res* 2008;14:155-61.
57. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, Andreeff M, Cortes J, Faderl S, Thomas D, Koller C, Wierda W, Detry MA, Lynn A, Kantarjian H. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:4079-88.
58. Moreton P, Kennedy B, Lucas G, Leach M, Rassam SM, Haynes A, Tighe J, Oscier D, Fegan C, Rawstron A, Hillmen P. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J Clin Oncol* 2005;23:2971-9.
59. Wierda W, O'Brien S, Wen S, Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas D, Do KA, Cortes J, Koller C, Beran M, Ferrajoli A, Giles F, Lerner S, Albitar M, Kantarjian H, Keating M. Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:4070-8.
60. Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995;85:1580-9.

61. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, De PL, Spina V, Gattei V, Capello D, Forconi F, Lauria F, Gaidano G. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 2009;15:995-1004.
62. Stilgenbauer S, Krober A, Busch R, Eichhorst B, Kienle D, Winkler D, Hopfinger G, Lichter P, Emmerich B, Hallek M, Dohner H, The GCLL. 17p Deletion Predicts for Inferior Overall Survival after Fludarabine - Based First Line Therapy in Chronic Lymphocytic Leukemia: First Analysis of Genetics in the CLL4 Trial of the GCLLSG. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2005;106:715.
63. Stilgenbauer S, Dohner H. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N Engl J Med* 2002;347:452-3.
64. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, Kwok M, Fenton JA, Plummer M, de TR, Owen RG, Richards SJ, Jack AS, Hillmen P. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2008;359:575-83.
65. Asplund SL, McKenna RW, Howard MS, Kroft SH. Immunophenotype does not correlate with lymph node histology in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2002;26:624-9.
66. Ben-Ezra J, Burke JS, Swartz WG, Brownell MD, Brynes RK, Hill LR, Nathwani BN, Oken MM, Wolf BC, Woodruff R, . Small lymphocytic lymphoma: a clinicopathologic analysis of 268 cases. *Blood* 1989;73:579-87.
67. Bonato M, Pittaluga S, Tierens A, Criel A, Verhoef G, Wlodarska I, Vanutysel L, Michaux L, Vandekerckhove P, Van den BH, De Wolf-Peeters C. Lymph node histology in typical and atypical chronic lymphocytic leukemia. *Am J Surg Pathol* 1998;22:49-56.
68. Dick FR, Maca RD. The lymph node in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1978;41:283-92.
69. Lennert K, Mohri N, Stein Hea. Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. Springer-Verlag:Berlin-Heidelberg-New York 1978.
70. Morrison WH, Hoppe RT, Weiss LM, Picozzi VJ, Jr., Horning SJ. Small lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol* 1989;7:598-606.
71. Swerdlow SH, Murray LJ, Habeshaw JA, Stansfeld AG. Lymphocytic lymphoma/B-chronic lymphocytic leukaemia--an immunohistopathological study of peripheral B lymphocyte neoplasia. *Br J Cancer* 1984;50:587-99.

72. Lennert K, Soehring M. Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas (Based on the Updated Kiel Classification). Springer-Verlag:New York-Berlin-Heidelberg 1990.
73. Oscier DG, Matutes E, Copplestone A, Pickering RM, Chapman R, Gillingham R, Catovsky D, Hamblin TJ. Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol* 1997;98:934-9.
74. Gall EA, Mallory TB. Malignant lymphoma: a clinicopathologic survey of 618 cases. *Am J Pathol* 1942;18:381-415.
75. Acker B, Hoppe RT, Colby TV, Cox RS, Kaplan HS, Rosenberg SA. Histologic conversion in the non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1983;1:11-6.
76. Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M, Hoskins PJ, Klasa RJ, Savage KJ, Sehn LH, Shenker TN, Gascoyne RD, Connors JM. Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2008;26:5165-9.
77. Bastion Y, Sebban C, Berger F, Felman P, Salles G, Dumontet C, Bryon PA, Coiffier B. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 1997;15:1587-94.
78. Cullen MH, Lister TA, Brearley RI, Shand WS, Stansfeld AG. Histological transformation of non-Hodgkin's lymphoma: a prospective study. *Cancer* 1979;44:645-51.
79. Garvin AJ, Simon RM, Osborne CK, Merrill J, Young RC, Berard CW. An autopsy study of histologic progression in non-Hodgkin's lymphomas. 192 cases from the National Cancer Institute. *Cancer* 1983;52:393-8.
80. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 1984;311:1471-5.
81. Hubbard SM, Chabner BA, DeVita VT, Jr., Simon R, Berard CW, Jones RB, Garvin AJ, Canellos GP, Osborne CK, Young RC. Histologic progression in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1982;59:258-64.
82. Montoto S, Davies AJ, Matthews J, Calaminici M, Norton AJ, Amess J, Vinnicombe S, Waters R, Rohatiner AZ, Lister TA. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25:2426-33.



83. Oviatt DL, Cousar JB, Collins RD, Flexner JM, Stein RS. Malignant lymphomas of follicular center cell origin in humans. V. Incidence, clinical features, and prognostic implications of transformation of small cleaved cell nodular lymphoma. *Cancer* 1984;53:1109-14.
84. Risdall R, Hoppe RT, Warnke R. Non-Hodgkin's lymphoma: a study of the evolution of the disease based upon 92 autopsied cases. *Cancer* 1979;44:529-42.
85. Williams CD, Harrison CN, Lister TA, Norton AJ, Blystad AK, Coiffier B, Taghipour G, Schmitz N, Goldstone AH. High-dose therapy and autologous stem-cell support for chemosensitive transformed low-grade follicular non-Hodgkin's lymphoma: a case-matched study from the European Bone Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* 2001;19:727-35.
86. Yuen AR, Kamel OW, Halpern J, Horning SJ. Long-term survival after histologic transformation of low-grade follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1995;13:1726-33.
87. Davies AJ, Rosenwald A, Wright G, Lee A, Last KW, Weisenburger DD, Chan WC, Delabie J, Braziel RM, Campo E, Gascoyne RD, Jaffe ES, Muller-Hermelink K, Ott G, Calaminici M, Norton AJ, Goff LK, Fitzgibbon J, Staudt LM, Andrew LT. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma proceeds by distinct oncogenic mechanisms. *Br J Haematol* 2007;136:286-93.
88. Lossos IS, Alizadeh AA, Diehn M, Warnke R, Thorstenson Y, Oefner PJ, Brown PO, Botstein D, Levy R. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: alternative patterns with increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8886-91.
89. Zelenetz AD, Chen TT, Levy R. Histologic transformation of follicular lymphoma to diffuse lymphoma represents tumor progression by a single malignant B cell. *J Exp Med* 1991;173:197-207.
90. Matolcsy A, Schattner EJ, Knowles DM, Casali P. Clonal evolution of B cells in transformation from low- to high-grade lymphoma. *Eur J Immunol* 1999;29:1253-64.
91. Carlotti E, Wrench D, Matthews J, Iqbal S, Davies A, Norton A, Hart J, Lai R, Montoto S, Gribben JG, Lister TA, Fitzgibbon J. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma may occur by divergent evolution from a common progenitor cell or by direct evolution from the follicular lymphoma clone. *Blood* 2009;113:3553-7.
92. Ruminy P, Jardin F, Picquenot JM, Parmentier F, Contentin N, Buchonnet G, Tison S, Rainville V, Tilly H, Bastard C. S(mu) mutation patterns suggest different progression pathways in follicular lymphoma: early direct or late from FL progenitor cells. *Blood* 2008;112:1951-9.

93. De Jong D, Voetdijk BM, Beverstock GC, van Ommen GJ, Willemze R, Kluin PM. Activation of the c-myc oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma. *N Engl J Med* 1988;318:1373-8.
94. Fiedler W, Weh HJ, Zeller W, Fonatsch C, Hillion J, Larsen C, Wormann B, Hossfeld DK. Translocation (14; 18) and (8; 22) in three patients with acute leukemia/lymphoma following centrocytic/centroblastic non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol* 1991;63:282-7.
95. Gauwerky CE, Hoxie J, Nowell PC, Croce CM. Pre-B-cell leukemia with a t(8; 14) and a t(14; 18) translocation is preceded by follicular lymphoma. *Oncogene* 1988;2:431-5.
96. Kroft SH, Domiati-Saad R, Finn WG, Dawson DB, Schnitzer B, Singleton TP, Ross CW. Precursor B-lymphoblastic transformation of grade I follicle center lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2000;113:411-8.
97. Young KH, Xie Q, Zhou G, Eickhoff JC, Sanger WG, Aoun P, Chan WC. Transformation of follicular lymphoma to precursor B-cell lymphoblastic lymphoma with c-myc gene rearrangement as a critical event. *Am J Clin Pathol* 2008;129:157-66.
98. Schmitz R, Renne C, Rosenquist R, Tinguely M, Distler V, Menestrina F, Lestani M, Stankovic T, Austen B, Brauninger A, Hansmann ML, Kuppers R. Insights into the multistep transformation process of lymphomas: IgH-associated translocations and tumor suppressor gene mutations in clonally related composite Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 2005;19:1452-8.
99. Feldman AL, Arber DA, Pittaluga S, Martinez A, Burke JS, Raffeld M, Camos M, Warnke R, Jaffe ES. Clonally related follicular lymphomas and histiocytic/dendritic cell sarcomas: evidence for transdifferentiation of the follicular lymphoma clone. *Blood* 2008;111:5433-9.
100. Cobaleda C, Busslinger M. Developmental plasticity of lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2008;20:139-48.
101. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 2007;21:18-29.
102. De Jong D. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol* 2005;23:6358-63.
103. Berglund M, Enblad G, Thunberg U, Amini RM, Sundstrom C, Roos G, Erlanson M, Rosenquist R, Larsson C, Lagercrantz S. Genomic imbalances during transformation from follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2007;20:63-75.

104. Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR, Theologides A. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1982;307:1231-6.
105. Boonstra R, Bosga-Bouwer A, Mastik M, Haralambieva E, Conradie J, van den BE, van den BA, Poppema S. Identification of chromosomal copy number changes associated with transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol* 2003;34:915-23.
106. Hough RE, Goepel JR, Alcock HE, Hancock BW, Lorigan PC, Hammond DW. Copy number gain at 12q12-14 may be important in the transformation from follicular lymphoma to diffuse large B cell lymphoma. *Br J Cancer* 2001;84:499-503.
107. Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Seagraves R, Blesa D, Rubio-Moscardo F, Albertson DG, Garcia-Conde J, Dyer MJ, Levy R, Pinkel D, Lossos IS. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood* 2003;101:3109-17.
108. Mohamed AN, Palutke M, Eisenberg L, Al-Katib A. Chromosomal analyses of 52 cases of follicular lymphoma with t(14;18), including blastic/blastoid variant. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;126:45-51.
109. Phan RT, la-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 2004;432:635-9.
110. Yano T, Jaffe ES, Longo DL, Raffeld M. MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood* 1992;80:758-67.
111. Elenitoba-Johnson KS, Gascoyne RD, Lim MS, Chhanabai M, Jaffe ES, Raffeld M. Homozygous deletions at chromosome 9p21 involving p16 and p15 are associated with histologic progression in follicle center lymphoma. *Blood* 1998;91:4677-85.
112. Pinyol M, Cobo F, Bea S, Jares P, Nayach I, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, Campo E. p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998;91:2977-84.
113. Villuendas R, Sanchez-Beato M, Martinez JC, Saez AI, Martinez-Delgado B, Garcia JF, Mateo MS, Sanchez-Verde L, Benitez J, Martinez P, Piris MA. Loss of p16/INK4A protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression. *Am J Pathol* 1998;153:887-97.

114. Matolcsy A, Casali P, Warnke RA, Knowles DM. Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene. *Blood* 1996;88:3937-44.
115. Akasaka T, Lossos IS, Levy R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood* 2003;102:1443-8.
116. Lossos IS, Levy R. Higher-grade transformation of follicle center lymphoma is associated with somatic mutation of the 5' noncoding regulatory region of the BCL-6 gene. *Blood* 2000;96:635-9.
117. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Kuppers R, la-Favera R. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001;412:341-6.
118. Halldorsdottir AM, Fruhwirth M, Deutsch A, Aigelsreiter A, Beham-Schmid C, Agnarsson BA, Neumeister P, Richard BW. Quantifying the role of aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma. *Leuk Res* 2008;32:1015-21.
119. Rossi D, Berra E, Cerri M, Deambrogi C, Barbieri C, Franceschetti S, Lunghi M, Conconi A, Paulli M, Matolcsy A, Pasqualucci L, Capello D, Gaidano G. Aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2006;91:1405-9.
120. De Vos S, Hofmann WK, Grogan TM, Krug U, Schrage M, Miller TP, Braun JG, Wachsmann W, Koefler HP, Said JW. Gene expression profile of serial samples of transformed B-cell lymphomas. *Lab Invest* 2003;83:271-85.
121. Elenitoba-Johnson KS, Jenson SD, Abbott RT, Palais RA, Bohling SD, Lin Z, Tripp S, Shami PJ, Wang LY, Coupland RW, Buckstein R, Perez-Ordóñez B, Perkins SL, Dube ID, Lim MS. Involvement of multiple signaling pathways in follicular lymphoma transformation: p38-mitogen-activated protein kinase as a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7259-64.
122. Gentles AJ, Alizadeh AA, Lee SI, Myklebust JH, Shachaf CM, Shahbaba B, Levy R, Koller D, Plevritis SK. A pluripotency signature predicts histologic transformation and influences survival in follicular lymphoma patients. *Blood* 2009;114:3158-66.
123. Fitzgibbon J, Iqbal S, Davies A, O'shea D, Carlotti E, Chaplin T, Matthews J, Raghavan M, Norton A, Lister TA, Young BD. Genome-wide detection of recurring sites of uniparental disomy in follicular and transformed follicular lymphoma. *Leukemia* 2007;21:1514-20.

124. O'shea D, O'Riain C, Gupta M, Waters R, Yang Y, Wrench D, Gribben J, Rosenwald A, Ott G, Rimsza LM, Holte H, Cazier JB, Johnson NA, Campo E, Chan WC, Gascoyne RD, Young BD, Staudt LM, Lister TA, Fitzgibbon J. Regions of acquired uniparental disomy at diagnosis of follicular lymphoma are associated with both overall survival and risk of transformation. *Blood* 2009;113:2298-301.
125. Martin-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, Bentink S, Ammerpohl O, Wickham-Garcia E, Rosolowski M, Richter J, Lopez-Serra L, Ballestar E, Berger H, Agirre X, Bernd HW, Calvanese V, Cogliatti SB, Drexler HG, Fan JB, Fraga MF, Hansmann ML, Hummel M, Klapper W, Korn B, Kuppers R, Macleod RA, Moller P, Ott G, Pott C, Prosper F, Rosenwald A, Schwaenen C, Schubeler D, Seifert M, Sturzenhofecker B, Weber M, Wessendorf S, Loeffler M, Trumper L, Stein H, Spang R, Esteller M, Barker D, Hasenclever D, Siebert R. New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood* 2009;113:2488-97.
126. O'Riain C, O'Shea DM, Yang Y, Le DR, Gribben JG, Summers K, Yeboah-Afari J, Bhaw-Rosun L, Fleischmann C, Mein CA, Crook T, Smith P, Kelly G, Rosenwald A, Ott G, Campo E, Rimsza LM, Smeland EB, Chan WC, Johnson N, Gascoyne RD, Reimer S, Braziel RM, Wright GW, Staudt LM, Lister TA, Fitzgibbon J. Array-based DNA methylation profiling in follicular lymphoma. *Leukemia* 2009;23:1858-66.
127. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, Montserrat E, Campo E, Banham AH. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 2006;108:2957-64.
128. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G, Villamor N, Colomo L, Martinez A, Hamoudi R, Howat WJ, Montserrat E, Campo E. High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2009;27:1470-6.
129. Armitage JO, Dick FR, Corder MP. Diffuse histiocytic lymphoma after histologic conversion: a poor prognostic variant. *Cancer Treat Rep* 1981;65:413-8.
130. Ersboll J, Schultz HB, Pedersen-Bjergaard J, Nissen NI. Follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma: long-term outcome with or without tumor progression. *Eur J Haematol* 1989;42:155-63.
131. Karam M, Novak L, Cyriac J, Ali A, Nazeer T, Nugent F. Role of fluorine-18 fluoro-deoxyglucose positron emission tomography scan in the evaluation and follow-up of patients with low-grade lymphomas. *Cancer* 2006;107:175-83.

132. Tsukamoto N, Kojima M, Hasegawa M, Oriuchi N, Matsushima T, Yokohama A, Saitoh T, Handa H, Endo K, Murakami H. The usefulness of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography ((18)F-FDG-PET) and a comparison of (18)F-FDG-pet with (67)gallium scintigraphy in the evaluation of lymphoma: relation to histologic subtypes based on the World Health Organization classification. *Cancer* 2007;110:652-9.
133. Wohrer S, Jaeger U, Kletter K, Becherer A, Hauswirth A, Turetschek K, Raderer M, Hoffmann M. 18F-fluoro-deoxy-glucose positron emission tomography (18F-FDG-PET) visualizes follicular lymphoma irrespective of grading. *Ann Oncol* 2006;17:780-4.
134. Cohen Y, Da'as N, Libster D, Amir G, Berrebi A, Polliack A. Large-cell transformation of chronic lymphocytic leukemia and follicular lymphoma during or soon after treatment with fludarabine-rituximab-containing regimens: natural history- or therapy-related complication? *Eur J Haematol* 2002;68:80-3.
135. Cao TM, Horning S, Negrin RS, Hu WW, Johnston LJ, Taylor TL, Shizuru JA, Hoppe RT, Brown BW, Blume KG, Stockerl-Goldstein KE. High-dose therapy and autologous hematopoietic-cell transplantation for follicular lymphoma beyond first remission: the Stanford University experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:294-301.
136. Chen CI, Crump M, Tsang R, Stewart AK, Keating A. Autotransplants for histologically transformed follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 2001;113:202-8.
137. Foran JM, Apostolidis J, Papamichael D, Norton AJ, Matthews J, Amess JA, Lister TA, Rohatiner AZ. High-dose therapy with autologous haematopoietic support in patients with transformed follicular lymphoma: a study of 27 patients from a single centre. *Ann Oncol* 1998;9:865-9.
138. Friedberg JW, Neuberger D, Gribben JG, Mauch P, Anderson KC, Soiffer RJ, Takvorian T, Fisher DC, Schlossman R, Jallow H, Kuhlman C, Ritz J, Freedman AS. Autologous bone marrow transplantation after histologic transformation of indolent B cell malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999;5:262-8.
139. Laudi N, Arora M, Burns LJ, Miller JS, McGlave PB, Barker JN, Ramsay NK, Orchard PJ, Macmillan ML, Weisdorf DJ. Long-term follow-up after autologous hematopoietic stem cell transplantation for low-grade non-Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:129-35.
140. Sabloff M, Atkins HL, ce-Bruckler I, Bredeson C, Fergusson D, Genest P, Hopkins H, Hutton B, Mcdiarmid S, Huebsch LB. A 15-year analysis of early and late autologous hematopoietic stem cell transplant in relapsed, aggressive, transformed, and nontransformed follicular lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:956-64.

141. Corradini P, Doderò A, Farina L, Fanin R, Patriarca F, Miceli R, Matteucci P, Bregni M, Scime R, Narni F, Pogliani E, Locasciulli A, Milani R, Carniti C, Bacigalupo A, Rambaldi A, Bonifazi F, Olivieri A, Gianni AM, Tarella C. Allogeneic stem cell transplantation following reduced-intensity conditioning can induce durable clinical and molecular remissions in relapsed lymphomas: pre-transplant disease status and histotype heavily influence outcome. *Leukemia* 2007;21:2316-23.
142. Hamadani M, Awan FT, Elder P, Lin TS, Porcu P, Benson DM, Blum KA, Devine SM. Feasibility of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for follicular lymphoma undergoing transformation to diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2008;49:1893-8.
143. Ramadan KM, Connors JM, Al-Tourah AJ, Song KW, Gascoyne RD, Barnett MJ, Nevill TJ, Shepherd JD, Nantel SH, Sutherland HJ, Forrest DL, Hogge DE, Lavoie JC, Bou-Mourad YR, Chhanabhai M, Voss NJ, Brinkman RR, Smith CA, Toze CL. Allogeneic SCT for relapsed composite and transformed lymphoma using related and unrelated donors: long-term results. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:601-8.
144. Rezvani AR, Storer B, Maris M, Sorrow ML, Agura E, Maziarz RT, Wade JC, Chauncey T, Forman SJ, Lange T, Shizuru J, Langston A, Pulsipher MA, Sandmaier BM, Storb R, Maloney DG. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in relapsed, refractory, and transformed indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2008;26:211-7.
145. Thomson KJ, Morris EC, Bloor A, Cook G, Milligan D, Parker A, Clark F, Yung L, Linch DC, Chakraverty R, Peggs KS, Mackinnon S. Favorable long-term survival after reduced-intensity allogeneic transplantation for multiple-relapse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2009;27:426-32.
146. Fisher RI, Kaminski MS, Wahl RL, Knox SJ, Zelenetz AD, Vose JM, Leonard JP, Kroll S, Goldsmith SJ, Coleman M. Tositumomab and iodine-131 tositumomab produces durable complete remissions in a subset of heavily pretreated patients with low-grade and transformed non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 2005;23:7565-73.
147. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, Czuczman MS, Emmanouilides C, Joyce R, Pohlman BL, Bartlett NL, Wiseman GA, Padre N, Grillo-Lopez AJ, Multani P, White CA. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2002;20:2453-63.

148. Friedberg JW, Cohen P, Chen L, Robinson KS, Forero-Torres A, La Casce AS, Fayad LE, Bessudo A, Camacho ES, Williams ME, van der Jagt RH, Oliver JW, Cheson BD. Bendamustine in patients with rituximab-refractory indolent and transformed non-Hodgkin's lymphoma: results from a phase II multicenter, single-agent study. *J Clin Oncol* 2008;26:204-10.
149. Lortholary P, Boiron M, Ripault P, Levy JP, Anus A, Bernard J. Chronic lymphoid leukemia secondarily associated with a malignant reticulopathy: Richter's syndrome. *Nouv Rev Fr Hematol* 1964;78:621-44.
150. Fayad L, Robertson LE, O'Brien S, Manning JT, Wright S, Hagemester F, Cabanillas F, Keating MJ. Hodgkin's disease variant of Richter's syndrome: experience at a single institution. *Leuk Lymphoma* 1996;23:333-7.
151. Tsimberidou AM, O'Brien S, Kantarjian HM, Koller C, Hagemester FB, Fayad L, Lerner S, Bueso-Ramos CE, Keating MJ. Hodgkin transformation of chronic lymphocytic leukemia: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer* 2006;107:1294-302.
152. Brecher M, Banks PM. Hodgkin's disease variant of Richter's syndrome. Report of eight cases. *Am J Clin Pathol* 1990;93:333-9.
153. Pescarmona E, Pignoloni P, Mauro FR, Cerretti R, Anselmo AP, Mandelli F, Baroni CD. Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia: an immunohistological, molecular and clinical study of four cases suggesting a heterogeneous pathogenetic background. *Virchows Arch* 2000;437:129-32.
154. Matolcsy A, Chadburn A, Knowles DM. De novo CD5-positive and Richter's syndrome-associated diffuse large B cell lymphomas are genotypically distinct. *Am J Pathol* 1995;147:207-16.
155. Kanzler H, Kuppers R, Helmes S, Wacker HH, Chott A, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg-like cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia represent the outgrowth of single germinal-center B-cell-derived clones: potential precursors of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Blood* 2000;95:1023-31.
156. Mao Z, Quintanilla-Martinez L, Raffeld M, Richter M, Krugmann J, Burek C, Hartmann E, Rudiger T, Jaffe ES, Muller-Hermelink HK, Ott G, Fend F, Rosenwald A. IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation: diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma in association with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) represent 2 different pathways of disease evolution. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1605-14.



157. Reiniger L, Bodor C, Bognar A, Balogh Z, Csomor J, Szepesi A, Kopper L, Matolcsy A. Richter's and prolymphocytic transformation of chronic lymphocytic leukemia are associated with high mRNA expression of activation-induced cytidine deaminase and aberrant somatic hypermutation. *Leukemia* 2006;20:1089-95.
158. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, De PL, Cresta S, Rasi S, Spina V, Franceschetti S, Lunghi M, Vendramin C, Bomben R, Ramponi A, Monga G, Conconi A, Magnani C, Gattei V, Gaidano G. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2008.
159. Smit LA, van Maldegem F, Langerak AW, van der Schoot CE, de Wit MJ, Bea S, Campo E, Bende RJ, van Noesel CJ. Antigen receptors and somatic hypermutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia with Richter's transformation. *Haematologica* 2006;91:903-11.
160. Timar B, Fulop Z, Csernus B, Angster C, Bognar A, Szepesi A, Kopper L, Matolcsy A. Relationship between the mutational status of VH genes and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma in Richter's syndrome. *Leukemia* 2004;18:326-30.
161. De Leval L, Vivario M, De PB, Zhou Y, Boniver J, Harris NL, Isaacson P, Du MQ. Distinct clonal origin in two cases of Hodgkin's lymphoma variant of Richter's syndrome associated With EBV infection. *Am J Surg Pathol* 2004;28:679-86.
162. Fong D, Kaiser A, Spizzo G, Gastl G, Tzankov A. Hodgkin's disease variant of Richter's syndrome in chronic lymphocytic leukaemia patients previously treated with fludarabine. *Br J Haematol* 2005;129:199-205.
163. Ohno T, Smir BN, Weisenburger DD, Gascoyne RD, Hinrichs SD, Chan WC. Origin of the Hodgkin/Reed-Sternberg cells in chronic lymphocytic leukemia with "Hodgkin's transformation". *Blood* 1998;91:1757-61.
164. Van der Berg A, Maggio E, Rust R, Kooistra K, Diepstra A, Poppema S. Clonal relation in a case of CLL, ALCL, and Hodgkin composite lymphoma. *Blood* 2002;100:1425-9.
165. Pistoia V, Roncella S, Di Celle PF, Sessarego M, Cutrona G, Cerruti G, Boccaccio GP, Grossi CE, Foa R, Ferrarini M. Emergence of a B-cell lymphoblastic lymphoma in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence for the single-cell origin of the two tumors. *Blood* 1991;78:797-804.
166. Lee A, Skelly ME, Kingma DW, Medeiros LJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia followed by high grade T-cell lymphoma. An unusual variant of Richter's syndrome. *Am J Clin Pathol* 1995;103:348-52.

167. Strickler JG, Amsden TW, Kurtin PJ. Small B-cell lymphoid neoplasms with coexisting T-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1992;98:424-9.
168. Giles FJ, O'Brien SM, Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia in (Richter's) transformation. *Semin Oncol* 1998;25:117-25.
169. Duchayne E, Delsol G, Kuhlein E, Klein B, Zhang XG, Attal M, Cassard G, Laurent G. Hairy cell transformation of a B-cell chronic lymphocytic leukemia: a morphological, cytochemical, phenotypic and molecular study. *Leukemia* 1991;5:150-5.
170. Gine E, Bosch F, Villamor N, Rozman M, Colomer D, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. Simultaneous diagnosis of hairy cell leukemia and chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: a frequent association? *Leukemia* 2002;16:1454-9.
171. Fraser CR, Wang W, Gomez M, Zhang T, Mathew S, Furman RR, Knowles DM, Orazi A, Tam W. Transformation of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma to interdigitating dendritic cell sarcoma: evidence for transdifferentiation of the lymphoma clone. *Am J Clin Pathol* 2009;132:928-39.
172. Bruzzi JF, Macapinlac H, Tsimberidou AM, Truong MT, Keating MJ, Marom EM, Munden RF. Detection of Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia by PET/CT. *J Nucl Med* 2006;47:1267-73.
173. Tsimberidou AM, O'Brien S, Khouri I, Giles FJ, Kantarjian HM, Champlin R, Wen S, Do KA, Smith SC, Lerner S, Freireich EJ, Keating MJ. Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2006;24:2343-51.
174. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995;333:1052-7.
175. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;352:804-15.
176. Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;97:2777-83.
177. Ginaldi L, De MM, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998;51:364-9.

178. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, Sison CP, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Vinciguerra VP, Budde P, Frey J, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002;99:4087-93.
179. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, la-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194:1625-38.
180. Han T, Sadamori N, Ozer H, Gajera R, Gomez GA, Henderson ES, Bhargava A, Fitzpatrick J, Minowada J, Bloom ML, . Cytogenetic studies in 77 patients with chronic lymphocytic leukemia: correlations with clinical, immunologic, and phenotypic data. *J Clin Oncol* 1984;2:1121-32.
181. Zhu Y, Monni O, Franssila K, Elonen E, Vilpo J, Joensuu H, Knuutila S. Deletions at 11q23 in different lymphoma subtypes. *Haematologica* 2000;85:908-12.
182. Han T, Henderson ES, Emrich LJ, Sandberg AA. Prognostic significance of karyotypic abnormalities in B cell chronic lymphocytic leukemia: an update. *Semin Hematol* 1987;24:257-63.
183. Robertson LE, Pugh W, O'Brien S, Kantarjian H, Hirsch-Ginsberg C, Cork A, McLaughlin P, Cabanillas F, Keating MJ. Richter's syndrome: a report on 39 patients. *J Clin Oncol* 1993;11:1985-9.
184. Bea S, Lopez-Guillermo A, Ribas M, Puig X, Pinyol M, Carrio A, Zamora L, Soler F, Bosch F, Stilgenbauer S, Colomer D, Miro R, Montserrat E, Campo E. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am J Pathol* 2002;161:957-68.
185. Fulop Z, Csernus B, Timar B, Szepesi A, Matolcsy A. Microsatellite instability and hMLH1 promoter hypermethylation in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003;17:411-5.
186. Lee JN, Giles F, Huh YO, Manshour T, O'Brien S, Kantarjian HM, Keating MJ, Albitar M. Molecular differences between small and large cells in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2003;71:235-42.
187. Volpe G, Gamberi B, Pastore C, Roetto A, Pautasso M, Parvis G, Camaschella C, Mazza U, Saglio G, Gaidano G. Analysis of microsatellite instability in chronic lymphoproliferative disorders. *Ann Hematol* 1996;72:67-71.

188. Arranz E, Martinez B, Richart A, Echezarreta G, Roman A, Rivas C, Benitez J. Increased C-MYC oncogene copy number detected with combined modified comparative genomic hybridization and FISH analysis in a Richter syndrome case with complex karyotype. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;106:80-3.
189. Cobo F, Martinez A, Pinyol M, Hernandez L, Gomez M, Bea S, Esteve J, Rozman M, Bosch F, Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Campo E. Multiple cell cycle regulator alterations in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002;16:1028-34.
190. Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, Vegna ML, Guglielmi C, Mancini F, Giuliaci S, Sacchi A, Mandelli F, Foa R. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998;91:4342-9.
191. Pinyol M, Hernandez L, Martinez A, Cobo F, Hernandez S, Bea S, Lopez-Guillermo A, Nayach I, Palacin A, Nadal A, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, Campo E. INK4a/ARF locus alterations in human non-Hodgkin's lymphomas mainly occur in tumors with wild-type p53 gene. *Am J Pathol* 2000;156:1987-96.
192. Aydin S, Rossi D, Bergui L, D'Arena G, Ferrero E, Bonello L, Omede P, Novero D, Morabito F, Carbone A, Gaidano G, Malavasi F, Deaglio S. CD38 gene polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: a role in transformation to Richter syndrome? *Blood* 2008;111:5646-53.
193. Hamblin TJ. Richter's syndrome--the downside of fludarabine? *Leuk Res* 2005;29:1103-4.
194. Janssens A, Berth M, De PP, Verhasselt B, Van RN, Noens L, Philippe J, Offner F. EBV negative Richter's syndrome from a coexistent clone after salvage treatment with alemtuzumab in a CLL patient. *Am J Hematol* 2006;81:706-12.
195. Thornton PD, Bellas C, Santon A, Shah G, Pocock C, Wotherspoon AC, Matutes E, Catovsky D. Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. The possible role of fludarabine and the Epstein-Barr virus in its pathogenesis. *Leuk Res* 2005;29:389-95.
196. Momose H, Jaffe ES, Shin SS, Chen YY, Weiss LM. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with Reed-Sternberg-like cells and possible transformation to Hodgkin's disease. Mediation by Epstein-Barr virus. *Am J Surg Pathol* 1992;16:859-67.
197. Ansell SM, Li CY, Lloyd RV, Phyliky RL. Epstein-Barr virus infection in Richter's transformation. *Am J Hematol* 1999;60:99-104.

198. Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer* 2005;103:216-28.
199. Foucar K, Rydell RE. Richter's syndrome in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1980;46:118-34.
200. Rausing A. Lymphatic leukemia and malignant lymphoma in the adult. A clinicopathologic study of their interrelationship. *Acta Med Scand Suppl* 1976;595:1-270.
201. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, Sala R, Cerretti R, Mandelli F. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood* 1999;94:448-54.
202. Armitage JO, Dick FR, Corder MP. Diffuse histiocytic lymphoma complicating chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1978;41:422-7.
203. Harousseau JL, Flandrin G, Tricot G, Brouet JC, Seligmann M, Bernard J. Malignant lymphoma supervening in chronic lymphocytic leukemia and related disorders. Richter's syndrome: a study of 25 cases. *Cancer* 1981;48:1302-8.
204. Jasani B, Gough J, Myers K, Wells AL. Gastrointestinal Richter's syndrome. *Hum Pathol* 1986;17:1184.
205. Parrens M, Sawan B, Dubus P, Lacombe F, Marit G, Vergier B, Reiffers J, de MA, Merlio JP. Primary digestive Richter's syndrome. *Mod Pathol* 2001;14:452-7.
206. Bayliss KM, Kueck BD, Hanson CA, Matthaues WG, Almagro UA. Richter's syndrome presenting as primary central nervous system lymphoma. Transformation of an identical clone. *Am J Clin Pathol* 1990;93:117-23.
207. O'Neill BP, Habermann TM, Banks PM, O'Fallon JR, Earle JD. Primary central nervous system lymphoma as a variant of Richter's syndrome in two patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1989;64:1296-300.
208. Beaudreuil J, Lortholary O, Martin A, Feuillard J, Guillevin L, Lortholary P, Raphael M, Casassus P. Hypercalcemia may indicate Richter's syndrome: report of four cases and review. *Cancer* 1997;79:1211-5.
209. Briones J, Cervantes F, Montserrat E, Rozman C. Hypercalcemia in a patient with chronic lymphocytic leukemia evolving into Richter's syndrome. *Leuk Lymphoma* 1996;21:521-3.

210. Cobo F, Rosinol L, Martinez A, Martin F, Esteve J, Gomez M, Nadal E, Bosch F, Javier SF, Campo E, Montserrat E. Limitations of Gallium-67 SPECT in histological transformation of chronic lymphocytic leukaemia: an analysis of 13 patients with clinically suspected Richter's syndrome. *Br J Haematol* 2002;119:484-7.
211. Partyka S, O'Brien S, Podoloff D, Kantarjian H, Keating MJ. The usefulness of high dose (7-10mci) gallium (67Ga) scanning to diagnose Richter's transformation. *Leuk Lymphoma* 1999;36:151-5.
212. Trump DL, Mann RB, Phelps R, Roberts H, Conley CL. Richter's syndrome: diffuse histiocytic lymphoma in patients with chronic lymphocytic leukemia. A report of five cases and review of the literature. *Am J Med* 1980;68:539-48.
213. Tsimberidou AM, O'Brien SM, Cortes JE, Faderl S, Andreeff M, Kantarjian HM, Keating MJ, Giles FJ. Phase II study of fludarabine, cytarabine (Ara-C), cyclophosphamide, cisplatin and GM-CSF (FACPGM) in patients with Richter's syndrome or refractory lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 2002;43:767-72.
214. Tsimberidou AM, Kantarjian HM, Cortes J, Thomas DA, Faderl S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Ferrajoli A, Wierda W, Alvarado Y, O'Brien SM, Albitar M, Keating MJ, Giles FJ. Fractionated cyclophosphamide, vincristine, liposomal daunorubicin, and dexamethasone plus rituximab and granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) alternating with methotrexate and cytarabine plus rituximab and GM-CSF in patients with Richter syndrome or fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2003;97:1711-20.
215. Tsimberidou AM, Wierda WG, Plunkett W, Kurzrock R, O'Brien S, Wen S, Ferrajoli A, Ravandi-Kashani F, Garcia-Manero G, Estrov Z, Kipps TJ, Brown JR, Fiorentino A, Lerner S, Kantarjian HM, Keating MJ. Phase I-II study of oxaliplatin, fludarabine, cytarabine, and rituximab combination therapy in patients with Richter's syndrome or fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2008;26:196-203.
216. Rodriguez J, Keating MJ, O'Brien S, Champlin RE, Khouri IF. Allogeneic haematopoietic transplantation for Richter's syndrome. *Br J Haematol* 2000;110:897-9.
217. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996;87:4990-7.







