



**Instituto Politécnico de Coimbra**

**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra**

**Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais**



**Instituto Politécnico  
de Coimbra**

# **O IMPACTO DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS NA SOBREVIDA E NOS ACHADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS EM LLC**

**RODOLFO XAVIER DE OLIVEIRA FERREIRA**

**Coimbra**

**2017**





Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais



Instituto Politécnico  
de Coimbra

## **O IMPACTO DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS NA SOBREVIDA E NOS ACHADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS EM LLC**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Artur Augusto Paiva, Professor Adjunto Convidado da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e coorientação do Professor Doutor Armando José Cerejo Caseiro, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.



Ao Professor Doutor Artur Paiva um agradecimento pelo empenho, esforço e dedicação que colocou na orientação e correção deste trabalho, bem como pelas sugestões e orientações dadas.

Ao Professor Doutor Armando Caseiro pela disponibilidade prestada e positivismo sempre presentes.

Ao Professor Doutor Fernando Rodrigues e Professora Doutora Letícia Ribeiro um agradecimento por me terem concedido a oportunidade de realizar este trabalho no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Universitário de Coimbra – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

## **Agradecimentos**

À Gisela Ferreira pela disponibilidade e apoio prestados.

À Ana Luísa Matias, Benilde Ferreira, aos meus avós e, novamente, Gisela Ferreira pelo apoio incondicional e por serem os meus pilares.

Ao Dr. Nuno Silva pela ajuda na obtenção de dados.

Ao Professor Doutor João Paulo Figueiredo pelo interesse e incessante ajuda no processamento dos dados.

À Sónia Sereno e Gina Neves pela compreensão e apoio facultados.



**Presidente:** Mestre Ana Maria de Figueiredo Valado,  
Professora Adjunta da ESTeSC, Especialista em Análises  
Clínicas e Saúde Pública.

## **Júri**

**Arguente:** Doutora Emília Nobre Barata Roxo Cortesão,  
Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina da  
Universidade de Coimbra.

**Orientador:** Doutor Artur Augusto Paiva, Professor Adjunto  
da ESTeSC.



## Resumo

**Introdução:** A detecção de alterações citogenéticas recorrentes tem sido de extrema relevância para o esclarecimento da heterogeneidade clínica observada na LLC, tendo as deleções 11q, 13q, 17p e a trissomia 12 valor de prognóstico conhecido e desempenhando um importante papel na patogênese e evolução da doença.

**Objectivos:** Analisar o impacto da presença/ ausência das alterações citogenéticas (deleções 13q14, 11q22, 17p13 e trissomia 12) nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, assim como nas comorbidades autoimunes, hipogamablobulinemia, sobrevida livre de terapêutica e global, subdivididas pelo grau de prognóstico associado.

**Material e Métodos:** Análise retrospectiva e descritiva de 227 doentes (130 homens; 97 mulheres) diagnosticados com LLC e com caracterização citogenética ao momento de diagnóstico. Os doentes foram distribuídos em 5 grupos mediante a presença e tipo de alterações citogenéticas ao diagnóstico: 1) Grupo controlo: sem alterações citogenéticas (n=73); 2) Grupo com alteração citogenética de bom prognóstico (n=58); 3) Grupo com alteração citogenética de prognóstico intermédio (n=37); 4) Grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico (n=59); 5) Grupo com alterações citogenéticas secundárias (n=26). Análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa *IBM SPSS Statistics 21*.

**Discussão/Conclusão:** A ausência de alterações citogenéticas e a presença da alteração citogenética del13q14 estão associadas a estágio Rai de baixo risco e a maior sobrevida livre de terapêutica. A ausência de alterações citogenéticas foi ainda associada a maior sobrevida global. A presença de alterações citogenéticas na LLC está associada à ocorrência de anemia hemolítica auto-imune e hipogamaglobulinemia. As alterações citogenéticas de mau prognóstico estão estatisticamente associadas a valores aumentados de leucócitos, linfócitos, prolinfócitos,  $\beta$ 2-M e valores diminuídos de plaquetas no momento anterior à terapêutica de 1ª linha. Estas alterações citogenéticas estão ainda associadas a um estágio Rai de alto risco e a menor sobrevida livre de terapêutica e global. A presença de alterações citogenéticas secundárias está estatisticamente associada a valores aumentados de prolinfócitos ao diagnóstico, assim como a valores aumentados de leucócitos, linfócitos, prolinfócitos e valores diminuídos de plaquetas, no momento anterior à terapêutica de 1ª linha. Estas alterações citogenéticas secundárias estão ainda associadas a menor sobrevida livre de terapêutica. A maioria das alterações citogenéticas adquiridas no decurso da doença (63,2%) são de mau prognóstico, sendo que a alteração citogenética secundária mais frequente foi a del17p13.

## Palavras Chave

LLC/LLPC, alterações citogenéticas, del11q22, del17p13, del13q14, +12





**Introduction:** The detection of recurrent cytogenetic abnormalities has been extremely important to clarify the clinical heterogeneity of CLL, having the deletions 11q, 13q, 17p and trisomy 12 a well known prognostic value as they play an important role in the pathogenesis and evolution of CLL.

**Objectives:** To analyze the impact of the presence/absence of cytogenetic abnormalities (deletions 13q14, 11q22, 17p13 and trisomy 12) in the hematological and biochemical parameters, as well as in autoimmune comorbidities, hypogammaglobulinemia, treatment-free and overall survival, divided by the degree of associated prognosis.

**Material & Methods:** Retrospective and descriptive analysis of 227 patients (130 men, 97 women) diagnosed with CLL with cytogenetic characterization. Patients were divided into 5 groups according with the presence and severity of cytogenetic abnormalities at the time of diagnosis: 1) Control group: without cytogenetic abnormalities (n=73); 2) Group with good prognosis cytogenetic abnormality (n=58); 3) Group with intermediate prognosis cytogenetic abnormality (n=37); 4) Group with poor prognosis cytogenetic abnormalities (n=59), 5) Group with secondary cytogenetic abnormalities (n=26). Statistical analysis using IBM SPSS Statistics 21 program.

**Conclusions:** Both the absence of cytogenetic abnormalities as well as the presence of the cytogenetic abnormality del13q14 were associated with low risk Rai stage and better therapeutic-free survival. The absence of cytogenetic abnormalities was also associated with an improved overall survival. The presence of cytogenetic abnormalities is associated with the occurrence of autoimmune hemolytic anemia and hypogammaglobulinaemia. The cytogenetic abnormalities of poor prognosis were statistically associated with increased values of leukocytes, lymphocytes, prolymphocytes,  $\beta$ 2-M and decreased values of platelets at the time prior to first-line therapy. These cytogenetic abnormalities are also associated with a high-risk Rai stage, lower treatment-free survival and overall survival. The presence of secondary cytogenetic abnormalities was statistically associated with increased values of prolymphocytes at the time of diagnosis, as well as increased values of leukocytes, lymphocytes, prolymphocytes and decreased values of platelets at the beginning of first-line therapy. These secondary cytogenetic abnormalities were also associated with lower treatment-free survival.

The majority of cytogenetic abnormalities acquired during the course of the disease (63.2%) were poor prognostic ones and the most frequently detected was the del17p13.

## Abstract

## Keywords

CLL/SLL, cytogenetic abnormalities, del11q22, del17p13, del13q14, +12

## Índice

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA .....	1
<i>Origem e Fisiopatologia</i> .....	1
<i>Definição</i> .....	4
<i>Epidemiologia</i> .....	5
<i>Características Clínicas e Diagnóstico</i> .....	5
<i>Morfologia</i> .....	7
<i>Imunofenotipagem</i> .....	8
<i>Citogenética</i> .....	8
<i>Score de Prognóstico</i> .....	15
<i>Indicadores de Prognóstico</i> .....	15
<i>Estratificação de risco</i> .....	17
<i>Evolução Clonal</i> .....	18
<i>Transformação</i> .....	19
<i>Evolução clonal e o seu papel na resistência à terapêutica</i> .....	19
<i>Carcinomas secundários</i> .....	20
<b>OBJETIVO DO ESTUDO</b> .....	<b>21</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	23
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>48</b>

## Índice de Tabelas

TABELA 1. INDICADORES DE PROGNÓSTICO NA LLC .....	15
TABELA 2. CLASSIFICAÇÃO RAI E BINET E RISCO ASSOCIADO .....	17
TABELA 3. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO COM BASE NA PRESENÇA/ AUSÊNCIA E TIPO DE ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS, RELATIVAMENTE AO NÚMERO DE DOENTES (N), PERCENTAGEM (%), RÁCIO QUANTO AO SEXO (HOMENS:MULHERES) E IDADE MÉDIA AO DIAGNÓSTICO (ANOS).....	22
TABELA 4. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO COM BASE NA PRESENÇA/ AUSÊNCIA E TIPO DE ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS, RELATIVAMENTE AO NÚMERO DE DOENTES (N), PERCENTAGEM (%), RÁCIO QUANTO AO SEXO (HOMENS:MULHERES) E IDADE MÉDIA AO DIAGNÓSTICO (ANOS).....	25
TABELA 5. VALORES HEMATIMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS NOS 5 GRUPOS DE LLC, AO DIAGNÓSTICO (T0) E NO MOMENTO ANTERIOR À TERAPÊUTICA DE 1ª LINHA (T1).....	27
TABELA 6. PERCENTAGEM DE DOENTES NOS ESTÁDIOS RAI, PARA OS 5 GRUPOS DE LLC .....	33
TABELA 7. SOBREVIDA LIVRE DE TERAPÊUTICA (MESES) .....	35
TABELA 8. SOBREVIDA GLOBAL DOS GRUPOS COM E SEM ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS (MESES). .....	37
TABELA 9. SOBREVIDA GLOBAL NOS 5 GRUPOS DE LLC (MESES) .....	38

## Índice de Figuras

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA DOS DOENTES COM LLC. ....	24
FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA POR SEXO. ....	24
FIGURA 3 - VALOR DE LINFÓCITOS NOS 5 GRUPOS DE LLC, EM T0 E T1. ....	28
FIGURA 4 - VALOR DE HEMOGLOBINA NOS 5 GRUPOS DE LLC, EM T0 E T1. ....	29
FIGURA 5 - VALOR DE PROLINFÓCITOS NOS 5 GRUPOS DE LLC, EM T0 E T1. ....	29
FIGURA 6 - FREQUÊNCIA DE COMORBILIDADES AUTO-IMUNES NA LLC. ....	30
FIGURA 7 - FREQUÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE, NOS GRUPOS DE LLC COM E SEM ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS. ....	31
FIGURA 8 - FREQUÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE HIPOGAMAGLOBULINÉMIA, NOS GRUPOS DE LLC COM E SEM ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS. ....	32
FIGURA 9 - PERCENTAGEM DE DOENTES NOS 3 ESTÁDIOS RAI AO DIAGNÓSTICO, NOS 5 GRUPOS DE LLC. ...	34
FIGURA 10 - PERCENTAGEM DE DOENTES NOS 3 ESTÁDIOS RAI ANTES DA TERAPÊUTICA DE 1ª LINHA, NOS 5 GRUPOS DE LLC. ....	34
FIGURA 11- SOBREVIDA LIVRE DE TERAPÊUTICA NOS 5 GRUPOS DE DOENTES COM LLC. A) VALOR DE $P=0,029$ , COMPARATIVAMENTE AO GRUPO COM ALTERAÇÃO CITOGENÉTICA DE BOM PROGNÓSTICO; B) VALOR DE $P=0,004$ , COMPARATIVAMENTE AO GRUPO COM ALTERAÇÃO CITOGENÉTICA DE PROGNÓSTICO INTERMÉDIO; C) VALOR DE $P=0,001$ , COMPARATIVAMENTE AO GRUPO COM ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS DE MAU PROGNÓSTICO; D) VALOR DE $P<0,001$ , COMPARATIVAMENTE AO GRUPO COM AQUISIÇÃO DE ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS NO DECURSO DA DOENÇA; E) VALOR DE $P=0,020$ , COMPARATIVAMENTE AO GRUPO COM AQUISIÇÃO DE ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS NO DECURSO DA DOENÇA. ....	36
FIGURA 12- SOBREVIDA GLOBAL NO GRUPO SEM ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E NO GRUPO COM ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS ....	37
FIGURA 13 - SOBREVIDA GLOBAL NOS 5 GRUPOS DE LLC. A) VALOR DE $P=0,024$ , COMPARATIVAMENTE AO GRUPO COM ALTERAÇÃO CITOGENÉTICA DE PROGNÓSTICO INTERMÉDIO; B) VALOR DE $P=0,008$ , COMPARATIVAMENTE AO GRUPO COM ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS DE MAU PROGNÓSTICO. ....	39
FIGURA 14 - PERCENTAGEM DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS SECUNDÁRIAS. ....	40

## Lista de Abreviaturas e Acrónimos

$\beta$ 2-M – Beta 2-microglobulina

Ac's – Anticorpos

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AEP – Aplasia eritróide pura

Ag's – Antígenos

AHAI – Anemia hemolítica autoimune

ATM - *Ataxia Telangiectasia Mutated*

BCR (*B-cell receptor*) – Receptor de Células B

BIRC3 (*Baculoviral IAP repeat-containing protein 3*)

C – Celsius

CD - *Cluster of differentiation*

ciAP2 (*cellular inhibitor of apoptosis protein 2*) – Proteína celular inibitória da apoptose 2

del – deleção

DLEU – *Deleted in Leukemia*

ESP – Esfregaço de sangue periférico

FAB (*French-American-British*) – Francesa-Americana-Inglesa

FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) – Hibridização *in situ* de fluorescência

Ig – Imunoglobulina

IgVH (*Immunoglobulin Heavy Chain*) – Cadeia Pesada de Imunoglobulina

IL – Interleucina

IWCLL (*International Workshop Group on CLL*) – Grupo Internacional (Workshop) de Leucemia Linfocítica Crónica

LDGC – Linfoma Difuso de Grandes Células B

LLC – Leucemia Linfocítica Crónica

LLC/LLPC – Leucemia Linfocítica Crónica/ Linfoma Linfocítico de Pequenas Células

LLP – Linfoma Linfoplasmocítico

LnH – Linfoma não-Hodgkin

LP – Linfoplasmócito

LPL-B - Leucemia Prolinfocítica de Células B

LPL-T – Leucemia Prolinfocítica de Células T

M:F – Masculino : Feminino

MBL – Linfocitose Monoclonal de Células B

MDM2 – *Murine double minute 2*

MLL (*Mixed Lineage Leukemia*) – Leucemia de linhagem mista

MO – Medula Óssea

mRNA – RNA mensageiro

NF-kB (*Nuclear Factor kappa B*)

NHL (*Non-Hodgkin Lymphoma*) – Linfoma Não Hodgkin  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PL- Prolinfócitos  
LLC/PL - Leucemia Linfocítica Crônica com excesso de Prolinfócitos  
PLCy2 (*Phospholipase Cy2*) – Fosfolipase Cy2  
POT1 – *Protection of telomeres 1*  
RNA (*Ribonucleic acid*) – Ácido Ribonucleico  
RR – Risco Relativo  
RS (*Richter Syndrome*) – Síndrome de Richter  
SD (*Standart Deviation*) – Desvio Padrão  
slg – Imunoglobulina de superfície  
SP- Sangue periférico  
TCTP (*Translationally controlled tumor proteins*) – Proteínas de tradução de tumor controladas  
TI – Trombocitopenia imune  
TP53 – *Tumor protein p53*  
VS – Velocidade de Sedimentação  
XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) – Proteína inibitória da apoptose ligada ao X







## Introdução

### Leucemia Linfocítica Crônica

#### **Origem e Fisiopatologia**

O mecanismo exato que está na base do aparecimento da Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é ainda desconhecido, contudo sabe-se que a sua heterogeneidade clínica é um reflexo das alterações genéticas e epigenéticas, assim como da influência do microambiente envolvido na sua patogênese.(1-3)

Alguns autores postulam que o evento inicial deverá ocorrer ao nível das células hematopoiéticas pluripotentes (*stem cells*), após terem verificado que as *stem cells* provenientes de um grupo de doentes com LLC eram capazes de originar linfócitos B clonais com fenótipo LLC-*like*.(4, 5)

Há trabalhos que elegantemente demonstraram que a transformação leucémica é iniciada por alterações genómicas específicas que causariam a deleção de genes, contendo micro-RNA específicos, aumentando a resistência dos linfócitos B à apoptose.(6-8)

Dados imunofenotípicos e de perfil de expressão genética sugerem que os clones de LLC derivam de linfócitos B imunocompetentes, selecionados para expansão clonal e eventual transformação, após múltiplos encontros e respostas a antígenos. Alguns autores defendem ainda de que se trata de uma patologia constituída por uma subpopulação de células da zona do manto.(4, 9-11). De facto, estas células são caracterizadas por uma expressão forte de IgM e baixa de IgD, sendo capazes de responder a polissacarídeos de bactérias e de forma independente dos linfócitos T, expressando genes mutados ou não mutados da região variável da cadeia pesada das Imunoglobulinas (*IG*). (10-12)

Outra teoria levanta a hipótese das células B de LLC poderem ser originadas de células B antes ou após passarem no centro germinal, que conduziria à existência de dois subtipos de células de LLC (13-17), nomeadamente células B com regiões IgVH não mutadas (pré centro-germinal) ou células B *naive*, e as células B com as regiões IgVH mutadas (pós centro-germinal) ou células B memória, após contato com o antígeno.(16-25) No entanto, estudos posteriores contrariaram esta teoria após observação de que, independentemente do estado mutacional do gene da *IGHV*, ambos os subgrupos partilhavam a mesma célula de origem, tendo já tido contato com o antígeno, apresentando um fenótipo de ativação (expressão de CD23, CD25, CD69 e de CD71) e perfis genéticos semelhantes.(13, 20-22, 26)

Nesta sequência, surgiu a hipótese da célula B que está na envolvida no aparecimento da LLC ser uma célula B memória, independentemente de haver mutação no gene *IGHV*. Esta hipótese explicaria a razão das células de LLC serem, na sua maioria, CD27+ (marcador de célula B memória).(27)

Atualmente estudos epigenéticos sugerem haver três subgrupos de LLC, com diferentes células de origem e características clínico-biológicas. Queirós et al, subdivide-os em LLC-*naive like*, *memory like* e *Intermediate*, tendo perfil epigenético de célula B pré-centro germinal, pós-centro germinal e célula de origem derivada de zona marginal B independente-centro germinal, respetivamente.(28, 29)

#### Estimulação pelo antigénio

A resposta da célula B à estimulação pelo antigénio é mediada pelo recetor de células B (BCR), nas células B normais e malignas. Cada célula B dispõe de um BCR distinto que é fruto da presença de regiões variáveis dos segmentos V, D e J na cadeia pesada das Ig, dos segmentos V e J na cadeia leve das Ig's e do emparelhamento das cadeias. Esta diversidade é aumentada pelo processo de hipermutação somática que ocorre a nível do centro germinal.(30)

O grau de hipermutação somática na célula B é avaliado pela comparação das sequências dos rearranjos genéticos da região variável da cadeia pesada das Ig, com as sequências obtidas na linha germinativa. Foram estabelecidas *guidelines* para análise dos rearranjos do gene da *IGHV*, no qual casos com menos de 98% de homologia com a linha germinal são considerados como tendo sido submetidos a hipermutação somática.(31)

O BCR é um complexo multimérico formado por uma imunoglobulina de superfície, associada ao heterodímero Ig $\alpha$ /Ig $\beta$  (CD79a/CD79b), responsável pela transdução de sinal. (9, 32, 33) Esta sinalização traduz um momento crucial do desenvolvimento da célula B normal, desempenhando um papel importante na diferenciação e secreção de anticorpos (Ac's), regulação positiva da mobilização e adesão celulares (em resposta a quimiocinas como a CXCL12 e/ou CXCL13), proliferação celular, através da indução da expressão de Myc, cinase 4 dependente da ciclina D2 em associação à presença de CD40 ligando (CD154) e IL-4 no microambiente medular e, por último, proteção contra a apoptose, mediada pela via PIK3/AKT e aumento de expressão de MCL1.(34-40)

Nos casos em que as células de LLC apresentam mutação no gene *IGHV*, os Ag's estimulam BCR, no entanto, nos casos em que as células de LLC não apresentam mutação no gene *IGHV*, são as próprias células de LLC que expressam epítomos a nível da membrana celular, que funcionam como auto-Ag's. Estes auto-Ag's estimulam BCR estereotípicas (não apresentam mutações somáticas na região variável da cadeia pesada de Ig), levantando a hipótese de que poderá ocorrer um fenómeno de auto-estimulação das células. Os BCR estereotípicos, ao possuírem subconjuntos quase idênticos das regiões da Ig, condicionam o reconhecimento de epítomos estruturalmente análogos, selecionando provavelmente os clones leucémicos.(41)

Mais de 20% dos casos de LLC têm um BCR estereotípico e aproximadamente 1% têm Ig's idênticas (o que não seria estatisticamente esperado), sendo que alguns clones de LLC partilham BCRs com sequências de aminoácidos bastante similares.(12, 41-50) Uma maior proporção de casos com genes *IGHV* não mutados, possui rearranjos estereotípicos dos segmentos V, D e J, tendo uma grande semelhança aminoácídica nas regiões CDR3 (região determinante de complementaridade 3).

Análises das sequências das regiões variáveis demonstraram que as células de LLC utilizam um repertório de genes *V* tendencioso, caracterizadas pela representação aumentada de determinados segmentos do gene das Ig, em especial *IGHV1-69*, *IGHV4-34*, *IGHV3-7* e *IGHV3-21*.(51, 52) As hipermutações somáticas não ocorrem de forma uniforme nos genes *IGHV* tendo, por exemplo, o *IGHV1-69* consistentemente menos mutações, comparativamente com os genes tipicamente mutados *IGHV3-7*, *IGHV3-23* e *IGHV4-34*. Células de LLC com gene *IGHV* não mutado são também caracterizadas pelas cadeias leves estereotípicas e padrões de mutações somáticas enviesadas.(53-55)

A natureza dos antígenos que estes BCR estereotípicos podem reconhecer e a sua importância na patogênese da doença continua desconhecida, apesar disso, a presença de rearranjos estereotípicos pode ter significado prognóstico.(44, 56) O grau notável de restrição estrutural de todo o BCR na LLC sugere que antígenos comuns são reconhecidos por células de LLC e apoia a hipótese de que um processo orientado por antígenos contribui para a patogênese desta doença.(45, 46) Os padrões de hipermutação somática do gene *IGHV* são processos característicos dos BCR que sofrem seleção de Ag's. Assim, autores sugerem que Ag's estarão envolvidos no desenvolvimento da patologia através da estimulação e proliferação de células B, expressando BCR com Ig codificadas por genes específicos.(57-59)

#### Reatividade do BCR

Ao longo do seu desenvolvimento, os linfócitos B adquirem a capacidade de produzir imunoglobulinas (Ig's) polirreativas, que reconhecem uma variedade de Auto-Ag's e apresentam reações cruzadas com Ag's bacterianos, sendo, por isso, um processo auto-reativo, cuja capacidade só se perde por seleção clonal após reconhecimento do antígeno e por mutações somáticas no gene *IGHV*, que ocorrem ao nível do centro germinal.(60-63)

Nas células de LLC com o gene *IGHV* não mutado, o BCR é geralmente polirreativo a auto-antígenos, devido a proteínas, lípidos endógenos ou exógenos gerados, por exemplo, por stress oxidativo.(42, 47, 62, 64) Por conseguinte, a produção natural de Auto-Ac's é frequente na LLC com gene *IGHV* não mutado, acontecendo algumas vezes na LLC com o gene mutado.(12)

### Significado clínico dos genes intervenientes no BCR

Na LLC ocorre uma desregulação das funções normalmente desempenhadas pelos linfócitos B, no entanto as células malignas possuem a capacidade de interagir com o meio ambiente.(3) De facto, o microambiente que as rodeia proporciona-lhes uma série de sinais que variam consoante os locais anatómicos. Estudos revelam que as células B monoclonais residentes nos gânglios linfáticos regulam positivamente mais de 100 genes que respondem à ativação do BCR e sinalização via NF-κB, estando igualmente envolvidos na proliferação celular.(65-67) A circulação, sobrevivência e proliferação das células B de LLC é finamente regulada pelo microambiente. A expressão de marcadores de ativação como o CD38 e CD69 assim como a proliferação celular estão aumentadas nas células B monoclonais do gânglio linfático e da MO, comparativamente às células do sangue periférico.(68-74)

Casos com o gene *IGHV* não mutado associam-se frequentemente a perfis citogenéticos adversos, evolução clonal e resistência a fármacos, traduzindo uma doença com carácter mais agressivo. Contrariamente, casos com hipermutação somática apresentam um curso clínico mais indolente e maior sobrevida global.(14, 15, 58) Há, desta forma, uma associação entre o estado da hipermutação somática dos genes *IGHV* e o prognóstico da doença.(75, 76) Apesar da generalidade dos casos de LLC mutados apresentarem um prognóstico mais favorável, há uma exceção, na qual doentes com o gene *IGHV3-21* mutado apresentam uma forma agressiva da doença, à qual se associa um prognóstico desfavorável.(17)

### Alterações epigenéticas

As alterações epigenéticas celulares, tal como a metilação anormal do ADN, podem contribuir para um fenótipo maligno, podendo ser transmitidas de uma geração para outra, influenciando consequentemente o risco da ocorrência de LLC.(77-81)

### **Definição**

A Leucemia Linfocítica Crónica é uma doença linfoproliferativa caracterizada pela acumulação de linfócitos B pequenos, maduros, monomórficos, redondos ou ligeiramente irregulares, no sangue periférico (SP), medula óssea (MO), baço e gânglios linfáticos, associados a prolinfócitos e paraimunoblastos, formando centros de baixa proliferação em infiltrados tecidulares.(82, 83) O termo Linfoma Linfocítico de Pequenas Células (LLPC) diz respeito aos casos não leucémicos, cujo envolvimento ganglionar assume maior representatividade, na ausência de citopenias devidas à infiltração da MO, apresentando valor de linfócitos B inferior a  $5 \times 10^9/L$  no sangue periférico e morfologia e imunofenótipo de LLC.(67, 82, 84-87)

Casos com valores de linfócitos B inferiores a  $5 \times 10^9/L$ , com perfil imunofenotípico típico de LLC, sem outros sinais ou sintomas de doenças linfoproliferativas, deverão ser considerados como Linfocitose Monoclonal de Células B LLC-*like* (MBL LLC-*like*).(86, 88)

A LLC caracteriza-se, ainda, pela acumulação progressiva de linfócitos monoclonais funcionalmente incompetentes, que escaparam ao programa de morte celular.(84, 89-93)

### ***Epidemiologia***

A LLC é a leucemia mais frequente em adultos no Ocidente, representando cerca de 11% de todas as doenças hematológicas e cerca de 25-30% de todas as leucemias nos Estados Unidos.(94, 95) A sua incidência é de cerca de 4.1 casos/ 100.000 habitantes/ ano, aumentando consideravelmente em idades avançadas (podendo chegar aos 12,8 casos/ 100.000/ ano).(96-104) Há um ligeiro predomínio do sexo masculino M:F = 1.5-2:1.(96, 105) Na Europa, a taxa de incidência entre homens e mulheres é 5.87 e 4.01, respetivamente, enquanto nos Estados Unidos é de 6.75 e 3.65.(97, 106) A idade média ao diagnóstico encontra-se entre os 65-72 anos.(105, 107, 108)

É a neoplasia hematológica com maior predisposição genética.(109, 110) Familiares de doentes com LLC têm 2 a 8 vezes maior risco de desenvolver a doença e 2 vezes maior risco de desenvolver Linfoma não Hodgkin, comparativamente à população geral.(111-115)

### ***Características Clínicas e Diagnóstico***

#### Características clínicas

A LLC é uma patologia amplamente heterogénea no que diz respeito à apresentação clínica, progressão e resposta ao tratamento. A maioria dos doentes é assintomática e a suspeita diagnóstica surge após a realização de um controlo analítico de rotina. Quando sintomáticos, os doentes podem referir sintomas B (perda  $\geq 10\%$  do peso corporal nos últimos 6 meses, febre superior a 38°C de origem desconhecida por mais de 2 semanas sem evidência de infeção, suores noturnos por mais de um mês sem evidência de infeção e/ou fadiga extrema), infeções de repetição, adenomegália ou infiltrados extraganglionares, sintomas relacionados com a presença de esplenomegália, hepatomegália, anemia e/ou trombocitopenia.(116-118)

Doentes com LLC podem desenvolver comorbilidades autoimunes, direcionadas contra as células hematopoiéticas, provavelmente como resultado de um sistema imunitário debilitado, sendo estas frequentemente graves e com risco de vida para o doente.(119-124). Os autoanticorpos dirigidos a antígenos presentes na membrana de eritrócitos ou das plaquetas são sintetizados por clones de células B não malignas, estando estes últimos relacionados com desregulação profunda do sistema imune.(125-134)

O aumento de incidência de citopenias autoimunes é secundária à formação de auto-anticorpos.(128, 135-140) A Anemia Hemolítica Auto-Imune (AHAI) é a citopenia imune mais frequentemente associada à LLC (5% a 10%), seguida da Trombocitopenia Imune (TI) e da Aplasia Eritróide Pura (AEP).(125, 129, 135-137, 140, 141) A ocorrência destas citopenias imunes ultrapassa os 25% dos casos em vários estudos. Doentes com citopenias devido a processos autoimunes parecem ter um melhor prognóstico, comparativamente aos que apresentam citopenias devido a falência

medular.(128, 138) A variação de sobrevida entre doentes sem citopenias e doentes com citopenias autoimunes não é estatisticamente significativa.(128, 138)

Não obstante, outros autores defendem que estádios mais avançados da doença, idade avançada, sexo masculino, gene *IGHV* não mutado e valores aumentados de leucócitos e de beta 2-microglobulina ( $\beta$ 2-M), associam-se à ocorrência de AHA1.(127-129, 136-138)

### Risco de infecção

A infecção é a maior causa de óbito em doentes com LLC.(142-147) A sua incidência aumenta em estádios avançados da doença e com o início do tratamento, devido à infiltração da medula óssea e disfunção imune induzida pela terapêutica.(143, 144, 147-150) Em metade dos casos de LLC ocorrem infecções recorrentes, sendo que mais de 50% destas são infecções graves.(151, 152)

Devido ao sistema imunológico debilitado, a hipogamaglobulinémia caracterizada por baixos níveis de Ac é muito frequente, ocorrendo em 25% dos doentes ao diagnóstico e até 100% no *follow-up* da doença.(143, 150, 153-159). A principal Ig afetada é a IgG, dos subtipos IgG3 e IgG4 e, com menor frequência, IgA e IgM.(160) Há uma estreita relação entre os níveis de IgG e a frequência e gravidade das infecções.(160) Há autores que defendem que a diminuição dos valores de IgA é preditor de infecção.(158, 161) A hipogamaglobulinémia é, por isso, um importante fator predisponente de infecção na LLC. (150, 151, 157, 161-164)

Além da hipogamaglobulinémia, os doentes com LLC também podem apresentar alterações na ativação do sistema do complemento, com uma resposta antibacteriana ineficaz.(165) Estas alterações são mais frequentes em fases avançadas da doença, mas o papel desempenhado no prognóstico da doença não é muito claro, uma vez que não se verificou uma associação direta entre falhas na opsonização e um aumento na frequência de infecções.(166)

### Diagnóstico

De acordo com o grupo internacional de estudo de LLC (*IWCLL*) de 2008, o diagnóstico de LLC faz-se pela presença de, pelo menos,  $5 \times 10^9$  /L linfócitos B no SP por um período superior ou igual a 3 meses, ou linfocitose inferior na presença de citopenia(s) ou sintoma(s) relacionado(s) com a doença, e um fenótipo característico de LLC com restrição clonal de cadeias leves (*kappa* ou *lambda*), expressão de CD5, CD23 e baixa expressão de CD20, CD79b e sIg.(83, 85, 167) Como referido anteriormente, o diagnóstico de LLPC requer contagem de linfócitos B no SP inferior a  $5 \times 10^9$ /L, presença de linfadenopatias e/ou esplenomegália e/ou hepatomegália, morfologia e imunofenótipo de LLC e ainda, se possível, confirmação histopatológica.

Não obstante, a revisão da OMS de 2016 não incluí no diagnóstico de LLC casos com valores de linfócitos B clonais no sangue periférico inferiores a  $5 \times 10^9$ /L, na ausência de doença extramedular ou presença de citopenia(s) ou sintoma(s) relacionado(s) com a doença.(168)

Ainda de acordo com a *IWCLL*, a presença de linfócitos B monoclonais com valor inferior a  $5 \times 10^9/L$  no SP, na ausência de linfadenopatias, hepatoesplenomegalia ou citopenias relacionadas com a doença ou ainda com sintomas B, é uma entidade denominada como Linfocitose Monoclonal de Células B (MBL).(85, 86, 88, 169, 170)

A MBL é considerada, na revisão de 2016 da OMS, como um precursor virtual de quase todos os casos de LLC/LLPC.(168, 171) A MBL e o LLPC têm valores de linfócitos B  $<5 \times 10^9/L$  no sangue periférico e imunofenótipo de LLC, sendo distinguidas pela ausência ou presença de linfadenopatias ou hepatoesplenomegalia.(85, 108, 172-174)

A MBL apresenta uma progressão para LLC de 1-2% /ano (169, 175-177), sendo que este valor diminui em doentes com clones de tamanho mais pequenos ( $<50$  células B/microL).(178, 179) Cerca de 3,5% dos adultos saudáveis com idade superior a 40 anos apresenta expansão de células B com fenótipo característico de LLC.(169, 175, 179-181) Há uma questão ética sobre a possibilidade de transmissão não intencional destas células por transfusão sanguínea ou transplante de células hematopoiéticas, estando a MBL presente em 7,1% dos doadores de sangue da América do Norte.(180-184)

A avaliação inicial do doente deve incluir anamnese, incluindo história familiar de LLC, exame físico detalhado, hemograma completo, reticulócitos, teste de *coombs* directo, velocidade de sedimentação, lactato desidrogenase (LDH),  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ -M), doseamento de Ig's, proteinograma eletroforético e imunofixação sérica, imunofenotipagem de SP, estudo da medula óssea com avaliação morfológica, imunohistoquímica e imunofenotípica. Outras provas potencialmente úteis são a realização de biópsia excisional de gânglio com avaliação citológica, imunohistoquímica e imunofenotípica. A realização de FISH (hibridização *in situ* de fluorescência em interfase) reserva-se habitualmente para caracterização mais pormenorizada da doença, previamente ao tratamento.

### **Morfologia**

O esfregaço de sangue periférico (ESP) é essencial para a suspeita diagnóstica. Através da sua observação podemos encontrar pequenos linfócitos com cromatina condensada e citoplasma escasso, prolinfócitos e/ou linfócitos de maior tamanho, linfócitos plasmocitóides ou com núcleo clivado.(85, 185, 186)

O citoesqueleto dos linfócitos de LLC apresenta défice de uma proteína filamentosa denominada vimentina, facto este que conduz a uma fragilidade celular e à fácil destruição destas células aquando da realização do ESP.(187, 188) Este artefacto denomina-se de manchas de *Gumprecht*, *basket cells* ou ainda *smudge cells*, sendo uma característica desta doença.(85, 186, 189, 190). Um estudo sugeriu que a presença de manchas de *Gumprecht* no ESP superior a 30% relaciona-se com mutação do gene *IGHV* e com um melhor prognóstico da doença.(188)

O valor de prolinfócitos (PL) em sangue periférico é frequentemente inferior a 2%. Valores superiores a 10% correlacionam-se com pior prognóstico.(191, 192) Segundo o sistema de classificação *FAB (French-American-British)*, a presença de PL entre 11 e 54% corresponde a uma entidade mista denominada LLC/PL. A LPL-B caracteriza-se pela presença de PL superior a 55%.(193, 194)

Os PL têm o dobro do tamanho dos linfócitos maduros, núcleo redondo, cromatina nuclear moderadamente condensada, nucléolo central proeminente e uma pequena quantidade de citoplasma ligeiramente basofílico.(195-198)

A presença de mais de 15% de linfócitos com cromatina menos condensada, linfócitos plasmocitóides, com irregularidades nucleares e menos de 10% de PL é característica da LLC atípica. Estes achados são mais frequentes na presença de alterações citogenéticas, nomeadamente a trissomia do cromossoma 12.(185) Um estudo concluiu que a morfologia celular aberrante é um marcador de prognóstico independente.(199)

Relativamente à citologia ganglionar, observa-se um apagamento da sua arquitectura habitual, com a formação de um padrão pseudo-folicular de áreas pálidas distribuídas regularmente, constituindo centros de proliferação dominados por linfócitos pequenos, prolinfócitos e para-imunoblastos. No baço pode ocorrer um envolvimento proeminente da polpa branca sendo que, por vezes, se encontram linfócitos com irregularidades nucleares e/ou com diferenciação plasmocitóide.

### ***Imunofenotipagem***

A LLC é normalmente diferenciada de outras patologias pela imunofenotipagem.(85, 104, 108, 186, 200) As células leucémicas têm marcadores de células B, nomeadamente CD19, CD20 (baixa expressão), CD43 e CD79b (baixa expressão) e devem ser CD5+. Além disso, as células apresentam restrição clonal da cadeia leve, baixa expressão de sIgM e IgD, e são CD23+ e CD10-. As células são também CD27+ (27), consistentes como sendo células B memória.(201)

A LLC típica deve ser sIg (baixa expressão), CD5+, CD23+, CD79b ou CD22 (baixa expressão), e FMC7-.(186)

### ***Citogenética***

Cerca de 80% dos casos de LLC apresentam alterações citogenéticas recorrentes, estando envolvidas em vias de reparação de dano do ADN, ciclo celular (*TP53, ATM, BIRC3*)(202), processamento de mRNA (*SF3B1 e XPO1*)(203), modificações da cromatina (*HIST1H1E, CHD2 e ZMYM3*), defeitos na proteção dos telómeros (*POT1*), sinalização Wnt, e NOTCH (*NOTCH1*)(204, 205), inflamação (*MYD88*)(206, 207), sinalização da célula B e transcrição (*EGR2 e BRAF*).(208-210)

As alterações citogenéticas, identificadas por *FISH* ou métodos *array (array-comparative genomic hybridization e SNP-array)*(75, 211-222), traduzem-se numa inalienável heterogeneidade biológica e clínica da LLC.(42, 75, 215, 223, 224)

## Alterações citogenéticas mais frequentes e a sua implicação

### Deleção 13q14

---

A deleção do braço longo do cromossoma 13 (del13q14) é a alteração citogenética mais comum na LLC, sendo detetada em 50% de todos os casos de LLC e historicamente associada a bom prognóstico.(13, 75, 213, 224-239) Estudos recentes consideram que a deleção isolada de 13q na LLC está associada a um grupo de muito baixo risco.(240, 241)

Na região da deleção 13q foram encontrados genes que desempenham importantes papéis na fisiopatologia de LLC. Estudos estruturais dos genes desta região revelaram que na MDR (*minimal deleted region*) está localizado o gene *DLEU2*, que codifica parte do primeiro exão de *DLEU1*, assim como dois microRNAs (família de genes não codificantes que estão envolvidos na regulação de genes específicos)(242) o miR-15a e miR16-1.(243) Estes dois microRNAs possuem função supressora tumoral, estando deletados ou regulados negativamente em 66% dos casos de LLC.(6, 243-246) Além destes microRNAs, outros genes localizados na região 13q14 podem estar envolvidos na atividade supressora de tumor, como é o caso do *DLEU7*.

Não obstante do bom prognóstico desta alteração citogenética quando surge isolada, há um gene que, quando envolvido na deleção 13q, relaciona-se com menor sobrevida livre de terapêutica e global- gene *RB1*. 60% dos doentes com a deleção 13q apresentam perda da MDR e 40% apresentam a perda do gene *RB1*. Por este facto, autores defendem que o prognóstico depende da extensão da deleção.(247-252)

Ocorrendo em cerca de 30% dos casos da deleção 13q (253), a presença de perdas bialélicas tem impacto clínico controverso, havendo autores que defendem que estas perdas bialélicas resultam da evolução de perdas monoalélicas, representando posteriormente uma forma mais agressiva da doença.(247, 254-257) Apesar desta forma mais agressiva, doentes com deleções 13q mono ou bialélicas não apresentam diferenças estatisticamente significativas quanto ao prognóstico.(254, 258, 259)

A heterogeneidade biológica e clínica dos doentes que apresentam a deleção 13q foi demonstrada pelo perfil de expressão genética e análises de microRNA.(260, 261) Com base na área da deleção 13q (pequena/bialélica *versus* ampla/monoalélica) foram traçados perfis de transcritos específicos que foram posteriormente correlacionados com dois subgrupos distintos de doentes. Assim, os doentes com grandes perdas de 13q demonstraram regulação negativa de 10 genes, incluindo o gene *TPT1/TCTP*, que está envolvido na sinalização de pró-sobrevivência e proliferação por inibição da apoptose induzida por BAX (bcl-2-like protein 4), inibição da p53 e sobre-expressão de 53 genes.(262-264) A maioria destes genes sobre-expressos está envolvida na mobilidade e adesão celulares, regulação da proliferação celular, metastização, angiogénese e apoptose. Nestes doentes, há uma marcada desregulação de vários microRNA e sobre-expressão de genes maioritariamente envolvidos

na sinalização do BCR (*SIK* e *CD79b*), sinalização via *NF-κB*, de sobrevivência e anti-apoptótica (sinalização *Wnt* e *RAS*). (261, 265)

Contrariamente a estes achados, um estudo de 2016 conclui que grandes deleções incluindo o gene *RB1* ou a presença da *del13q14* bialélica não é suficiente para ser considerada como um fator de prognóstico adverso na LLC/LLPC. (266)

De salientar ainda que outros processos podem inativar a região 13q14, tais como perda de heterozigotia, silenciamento epigenético pela metilação de ADN ou desacetilação das histonas. (245, 267, 268)

### Deleção 11q22 (gene *ATM*)

---

A deleção no braço longo do cromossoma 11 (*del11q22*) ocorre em cerca de 10-25% dos doentes com LLC, estando tipicamente associada a mau prognóstico. (13, 75, 200, 225-227, 269-271) Estas deleções são altamente variáveis quanto ao seu tamanho, podendo ser classificadas como grandes deleções/clássicas (mais comuns) ou então como pequenas deleções/atípicas (de ocorrência mais rara e mais frequentemente associadas com mutações *ATM*). (272, 273) A MDR (*minimal deleted region*) inclui as bandas cromossómicas 11q22.3-q23.1, e contém o gene *ATM* em quase todos os casos.

Estudos de complementaridade de ADN (*microarray*) demonstraram que a *del11q* tem um padrão de expressão genético diferente na LLC, envolvendo genes sobre-expressos que estão envolvidos na sinalização celular e apoptose. (270, 271, 274)

O gene *ATM* codifica uma cinase nuclear, cuja atividade é induzida pela rotura da cadeia dupla do ADN que surge endogenamente ou após exposição a agentes que danificam o ADN (incluindo radiações ionizantes e quimioterapia). (275) Este gene intervém na fosforilação de proteínas chave, envolvidas na ativação da reparação ao dano de ADN e protegendo a integridade do genoma pela regulação do ciclo celular.

As mutações no gene *ATM* foram amplamente estudadas em doentes com LLC com a *del11q*, contudo em apenas 8 a 30% destes foi detetada a mutação no gene *ATM*, indicando que outros genes podem desempenhar um papel na fisiopatologia da deleção 11q na LLC. (275-280) Um desses genes é o *BIRC3*, localizado proximamente do gene *ATM* (região 11q22). (265)

O gene *BIRC3* é um regulador negativo de um fator de transcrição que, quando ativo, promove a proliferação celular (*NF-κB*). (281, 282) Ao diagnóstico de LLC, 4% dos doentes apresentam alterações neste gene, estando estas associadas a fenótipos refratários à quimioterapia (nomeadamente, fludarabina) (202, 281). Interessante é também o facto de doentes com LLC com danos no gene *BIRC3* possuírem, ao mesmo tempo, alterações no gene *TP53*. Este é, por sua vez, responsável pela fosforilação e ativação da p53, após dano no ADN. (278, 283) Uma vez que a maior parte dos mecanismos de ação de alguns fármacos está dependente da *TP53*, a ocorrência destas alterações citogenéticas compromete em muito a eficácia destas terapêuticas. (13, 241, 284, 285)

A deleção 11q é detetada frequentemente em doentes jovens e está associada a linfadenopatia marcada, rápida progressão da doença, menor sobrevida e a fatores de mau prognóstico, tal como a ausência de mutações no gene *IGHV*.(13, 75, 270, 271, 278, 286-288)

### Trissomia 12 (+12)

---

A trissomia do cromossoma 12 (+12) verifica-se em 10-20% dos doentes com LLC ao diagnóstico e frequentemente surge isolada (40-60%).(75, 225-227) A +12 pode, no entanto, associar-se a outras alterações citogenéticas, tais como trissomias dos cromossomas 18 e 19, deleções recorrentes na LLC (14q, 13q, 11q ou 17p) e translocações no gene da *IGH*.(75, 289)

A +12 é considerada um fator de risco intermédio no modelo de prognóstico proposto por Dohner et al.(75) Não obstante os primeiros estudos demonstrarem que esta alteração citogenética estava associada a um curso clínico mais agressivo (290, 291), atualmente autores tendem a considerá-la de risco intermédio ou mesmo de baixo risco.(241, 250)

Esta alteração citogenética foi recentemente associada a mutações no gene *NOTCH1*, especialmente nos doentes com pior prognóstico (com o gene *IGHV* não mutado). A maior frequência de casos com mutação em *NOTCH1*, assim como expressão de CD38 ou CD49d pode, em parte, explicar o mau prognóstico observado neste subgrupo de doentes.(292-294) A +12 é considerada uma alteração clonal que ocorre nos estadios iniciais da doença, facilitando o aparecimento de alterações genéticas secundárias como por exemplo mutações *NOTCH1*, *TP53*, entre outros.(295, 296) Além disto, casos de +12 que apresentam concomitantemente mutações nos genes *IGHV* podem facilmente adquirir outras alterações citogenéticas.(297)

Os genes *BAX* ou *E2F1*, apesar de não estarem localizados no cromossoma 12, estão associados a cinases localizadas neste cromossoma. O gene *E2F1* codifica um fator de transcrição associado à proliferação celular e a sua atividade é regulada por cinases como *CDK4*, localizadas em 12q14.1. A sobre-regulação de *CDK4*, por sua vez, pode contribuir para a sobre-expressão de *E2F1* nos doentes com +12 e conduzir a um aumento da proliferação celular nestes casos.(298)

A +12 é geralmente detetada nos casos de variantes de LLC (LLC/PL e LLC atípica), o que pode explicar o mau prognóstico associado a estas patologias.(291, 299, 300) Morfologia e fenótipo atípicos são, por isso, característicos de LLC com +12.(292, 301)

### Deleção 17p13 (*TP53*)

---

Doentes com LLC e deleção do braço curto do cromossoma 17 (del17p13) foram, desde sempre, incluídos num grupo de risco de prognóstico desfavorável devido à constatação de que, neste grupo, ocorria uma rápida progressão da doença, má resposta à terapêutica e, associadamente, menor sobrevida livre de terapêutica e global.(13, 75) Isto pode ser explicado não só pela desregulação do ciclo celular (causado pela perda de *TP53*, no *locus* 17p13), mas também pelo uso habitual de

quimioterapia nestes doentes, sendo ambos preditores independentes na sobrevida global e livre de terapêutica.(210, 240, 241, 284, 285, 289, 302-309)

A deleção 17p associa-se frequentemente à mutação do gene *TP53* (>80%), pelo que estes indivíduos apresentam uma doença mais agressiva sob o ponto de vista biológico e clínico.(75, 284, 310-314)

O *TP53* é um gene supressor tumoral localizado no braço curto do cromossoma 17 (17p13), que codifica a proteína p53. Quando ativada por radiações ionizantes, lesões do ADN, presença de óxido nítrico, hipóxia, quimioterapia ou estímulo oncogénico, esta proteína conduz à paragem do ciclo celular (transição das fases G<sub>1</sub>/S e G<sub>2</sub>/M), ligação e reparação do ADN, apoptose e indução da senescência.(315-320) Intervém ainda na mediação pro-apoptótica e antiproliferativas, induzida por vários agentes quimioterapêuticos com dano do ADN.(320)

Na LLC, o gene *TP53* pode ser inativado por deleção, mutação somática (levando à alteração da estrutura da proteína e à ausência parcial ou total de função) ou pela sobre-expressão de *MDM2*.(75, 285, 304-306, 309, 321, 322) O gene *MDM2* codifica a ubiquitina ligase específica da p53 e medeia a sua degradação (tendo elevada expressão em 50 a 70% dos doentes), estando envolvida na inibição de um largo número de genes dependentes da p53 e miRNAs, incluindo o miR34a.(323) A expressão diminuída deste microRNA está também envolvida na regulação da senescência, apoptose, ciclo celular e pode estar relacionada com curso agressivo da doença.(324)

A ocorrência da deleção 17p13 aumenta ao longo da história natural da LLC: ao diagnóstico estima-se que esteja presente em cerca de 4-8% dos doentes; aquando do início do tratamento de primeira linha, cerca de de 10-12% dos doentes; em contexto de doença quimiorrefratária, a incidência aumenta para 30-40%.(75, 225-227, 284, 307, 314, 325-329) Desta forma é possível especular que a ocorrência da inativação do gene *TP53* apresenta um importante papel na evolução clonal da doença.(285, 298, 313, 314, 328, 330-332)

Evidenciando a importância deste gene na evolução clonal da doença, estudos demonstraram que subclones de LLC com mutações no gene *TP53* podem tornar-se dominantes e conduzir a uma doença quimiorrefratária e a menor sobrevida global.(333)

Metade dos doentes com del17p13 necessita de tratamento até 3 anos após o diagnóstico, contudo um terço terá doença estável.(325) No momento do primeiro tratamento, 10% dos doentes são resistentes à quimioterapia, e apenas um terço destes sobrevive aos 3 anos.(284)

Se esta alteração citogenética for primária (*de novo*) a sobrevida global é de cerca de 4 a 5 anos. No entanto, se se tratar de uma alteração citogenética secundária, verifica-se um decréscimo acentuado na sobrevida global (1 a 1,5 anos).(325)

A presença de del17p13 associa-se a fenótipos atípicos: expressão elevada de CD20, FMC7, CD79b e slg.(292) Além disto, o aumento de expressão de CD38, ZAP-70 e *IGHV* não mutado foi encontrado em casos de 17p-, estando relacionados com o mau prognóstico deste grupo de doentes.(225, 292,

334) Outros estudos demonstraram correlações significativas entre a presença de 17p- e 4p-, 18p-, 20p-, ou alterações no cromossoma 8 (8p- ou 8q+).(250, 335)

#### Translocações que envolvem o gene *MYC*

---

As translocações que envolvem o gene *MYC* (8q24.21) estão presentes em menos de 1% dos casos de LLC e caracterizam um subgrupo específico de doentes com prognóstico desfavorável.(336, 337) Na maioria destes casos encontram-se prolinfócitos, por isso pensa-se que as translocações envolvendo *MYC* podem ser um evento secundário na LLC, com importante papel na evolução da doença.(337, 338)

#### Translocação 14q32

---

A translocação 14q32 envolvendo a cadeia pesada das Ig ocorre em 7% dos doentes com LLC.(75, 217, 339) Esta translocação é bastante frequente no Mieloma Múltiplo e Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado.(340, 341)

#### Translocação t(14;18)(q32;q21)

---

Ao justapor o gene *BCL2* presente no cromossoma 18, ao gene *IGH* presente no cromossoma 14, este último age como promotor do primeiro resultando numa sobre-expressão da proteína bcl-2 e inibição da apoptose.(342, 343) Não obstante, há autores que defendem que a t(14;18) em doentes com LLC, não se associa a cariótipos complexos ou características agressivas na doença.(336)

#### Translocação t(14;19)(q32;q13.1)

---

A translocação t(14;19)(q32;q13.1) é um evento raro envolvendo o locus *BCL3* no cromossoma 19. Associa-se a morfologia e fenótipo atípicos, presença da +12, a cariótipo complexo, *IGHV* não mutado, mau prognóstico e rápida progressão da doença.(344)

#### Mutações *NOTCH1*

---

Mutações no gene *NOTCH1* foram identificadas como importantes marcadores de prognóstico na LLC.(205, 294, 345-349) Estas mutações diminuem a taxa de *clearance* da proteína NOTCH1, aumentando assim os níveis e atividade desta proteína.(215) Por conseguinte, ocorre um aumento da proliferação celular (pelo aumento da atividade de NF-kB) e aumento da inibição da apoptose.(347)

As mutações *NOTCH1* caracterizam um subgrupo de doentes que apresentam um estágio clínico avançado, expressão de CD38, ZAP-70, +12 e gene *IGHV* não mutado, quimiorrefratariedade e menor sobrevida global.(204, 205, 294, 345, 347, 348, 350, 351)

Ocorrem em 4 a 10% dos doentes, contudo a incidência aumenta consideravelmente em doentes com +12 (41,9%), quimiorrefratários (20%) e doentes com síndrome de Richter (33%).(205, 294, 345, 349)

Estudos epigenéticos recentes verificaram um aumento da ocorrência desta mutação em doentes com perfil epigenético LLC-*naive*.(29)

#### Genes da via de sinalização Wnt (*Wingless type*)

---

Wnt é uma larga família de glicoproteínas envolvidas na proliferação e diferenciação celulares e oncogénese.(352-355)

Na LLC ocorre sobre-expressão de alguns genes Wnt e a sinalização descontrolada pode contribuir para o defeito na apoptose que caracteriza esta patologia.(356-358)

De facto, estudos experimentais revelaram que o silenciamento de genes mutados da via de sinalização Wnt conduz à perda da viabilidade celular, sugerindo interligação entre as células de LLC e a ativação por esta via de sinalização.(359-361) Desta forma, há autores que consideram a via de sinalização Wnt um potencial alvo terapêutico.(358, 362).

#### Gene *Protection of Telomeres 1 (POT1)*

---

O gene *POT1* está envolvido na resposta ao dano de ADN, mais concretamente na proteção dos telómeros. A mutação neste gene tem como resultado a existência de várias alterações teloméricas e cromossómicas na LLC. (209)

#### Gene *Splicing Factor 3B subunit 1 (SF3B1)*

---

O gene *SF3B1* é componente crítico na maquinaria de *splicing* de ADN, realizando a transcrição e garantindo a diversidade funcional de proteínas, através do *splicing alternativo*.(281) Mutações neste gene conduzem a alterações do *splicing* do mRNA (remoção dos intrões e união de exões, após transcrição do RNA) e estão associadas a rápida progressão da doença e menor sobrevida global.(350, 363, 364) Esta alteração genética foi recentemente associada à alteração de resposta ao dano de ADN.(365)

Estudos epigenéticos recentes verificaram um aumento da ocorrência desta mutação em doentes com perfil epigenético LLC-*intermediate*.(29)

### Score de Prognóstico

Foi desenvolvido um score de prognóstico tendo em conta as características moleculares e/ou citogenéticas dos doentes.(241)

O grupo de alto risco abrange a del17p, p53 (*TP53*) e/ou *BIRC3*, com 51% de sobrevivência aos 5 anos e 29% aos 10 anos e alterações a nível do *NOTCH1* e/ou *SF3B1* e/ou del11q22 (*ATM*), caracterizando-se por uma sobrevida global aos 5 anos de 66% e aos 10 anos de 37%. O grupo de risco intermédio inclui a +12, apresentando 78% de sobrevida global aos 5 anos e 57% aos 10 anos. O grupo de baixo risco inclui a alteração citogenética del13q, cuja sobrevida global aos 5 anos é de 87% e aos 10 anos de 69%.(241, 265)

A identificação das deleções 17p13 ou 11q22 são particularmente importantes, pois a sua presença tem um grande impacto no prognóstico, sendo determinante na escolha da terapêutica.(75, 200, 284, 366-368)

### Indicadores de Prognóstico

Ao longo dos anos, vários marcadores de prognóstico foram validados para a LLC, nomeadamente sexo, idade, alterações citogenéticas incluindo del17p e del11q,  $\beta$ 2-M, estádios Rai e Binet, entre outros.(76, 217, 226, 369-371)

A Tabela 1 resume os principais marcadores de prognóstico. (366, 372-378)

**Tabela 1. Indicadores de Prognóstico na LLC**

Indicadores de Prognóstico na LLC		
Marcador de Prognóstico	Melhor Prognóstico	Pior Prognóstico
<b>Sexo</b>	Feminino	Masculino
<b>Idade</b>	< 70 anos	>70 anos
<b>Estádio RAI</b>	0, I e II	III e IV
<b>Nº linfócitos</b>	<12x10 <sup>9</sup> /L	>12x10 <sup>9</sup> /L
<b>FISH</b>	Deleção 13q	Deleção 11q ou 17p
<b>Mutação IGHV</b>	Mutado	Não mutado

#### Sexo e Idade

Um estudo publicado em 2016 identificou a idade como sendo um fator independente de prognóstico, na LLC.(379) Estudos anteriores concluíram que a idade superior ou inferior a 55 anos, (correspondendo a 75% e 25% da população de LLC, respetivamente) não tinha impacto no estágio ao diagnóstico, nem nas características clínicas ou outros marcadores de prognóstico. (373, 380, 381)

Relativamente ao sexo, há uma predisposição de género, sendo o sexo masculino mais frequentemente afetado, sendo o rácio homem - mulher (H:M) de 1,5-2:1.(83, 105, 374, 382)

### Valor de Linfócitos

Ao diagnóstico, o valor de linfócitos B é inversamente proporcional à sobrevida.(377, 383) Valores superiores a  $11 \times 10^9/L$  estão relacionados com menor sobrevida livre de terapêutica e sobrevida global.(377) Doentes que dupliquem o valor de linfócitos em menos de 12 meses, têm uma diminuição significativa da sobrevida.(384, 385)

O valor médio de linfócitos na altura do diagnóstico de LLC encontra-se habitualmente entre 20 a  $30 \times 10^9/L$ , ocorrendo um aumento progressivo do seu valor ao longo do tempo.(373, 381, 386). Poderão também verificar-se flutuações da contagem linfocitária em doentes que se encontram em vigilância, podendo haver doentes que mantêm linfocitose estável durante muitos anos.(373)

### Beta 2- Microglobulina

Níveis elevados de  $\beta 2$ -M associam-se a menor sobrevida livre de progressão, particularmente em estádios iniciais, estando também relacionados menor sobrevida global e elevados níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias.(284, 379, 386-408)

### Lactato Desidrogenase

Os níveis plasmáticos de Lactato Desidrogenase (LDH) medem o grau de *turnover* celular, constituindo, desta forma, um indicador geral da presença e severidade de dano celular.(372, 391) Valores elevados de LDH associam-se à presença da deleção 17p13, a menor sobrevida e progressão da doença, constituindo um válido e independente fator de prognóstico.(226, 372, 409-413)

### Prolinfócitos

Existe uma forte evidência entre a presença e/ou valor aumentado de prolinfócitos e o comportamento da doença, nomeadamente no que diz respeito à rapidez da progressão da doença, estádios de doença avançados e presença de alterações citogenéticas, particularmente a +12 e alterações da p53.(186) Aproximadamente 15% dos indivíduos com LLC apresentam um número aumentado de prolinfócitos no ESP (superior a 10%), estando associado a pior prognóstico.(186, 191, 192)

### Estádios de Rai

O sistema de estratificação de Rai foi inicialmente proposto em 1975 e baseia-se no pressuposto que, ao longo da história natural da doença, há uma acumulação progressiva de linfócitos não funcionais.(117) Este sistema dividia os doentes em 5 grupos (0, I, II, III e IV), com base na presença de linfocitose isolada (contagem de linfócitos  $\geq 15 \times 10^9/L$  no SP e  $\geq 40\%$  na MO), linfadenopatia ou esplenomegalia, presença de anemia (Hb < 11,0 g/dL) ou trombocitopenia (plaquetas <  $100 \times 10^9/L$ ). (117) Ao diagnóstico da LLC, 25% dos doentes estão no estágio 0, 50% no estágio I e II, e 25% no estágio III e IV(13).

O sistema de Rai foi posteriormente revisto e simplificado com a introdução de 3 categorias de risco: baixo, intermédio e alto.(85) O estágio 0 foi considerado de baixo risco, os estádios I e II de risco intermédio e os estádios III e IV considerados de alto risco.(85)

A sobrevida global média dos doentes no estágio Rai de baixo risco (55-60% dos casos) é superior a 10 anos.(104, 176, 366, 414-418); doentes que integram o estágio Rai de risco intermédio (35-40% dos casos) têm uma sobrevida global média de 7 a 9 anos; doentes no estágio Rai de alto risco (5-10% dos casos) têm uma sobrevida global média inferior (1,2 a 5 anos).

Estádios avançados da doença, com presença de anemia e trombocitopenia ao diagnóstico, são fatores de mau prognóstico e estão presentes em 20% dos casos e em mais de 20% dos casos há a presença de sintomas B.(118, 396)

### **Estratificação de risco**

Os sistemas de estádios clínicos Rai e Binet são instrumentos simples e válidos que permitem definir a extensão da doença e o seu prognóstico.(116, 117) Desta forma, permitem a estratificação de risco dos doentes e a respetiva orientação da decisão terapêutica: intenção de tratamento *versus* vigilância. Atualmente recomenda-se o uso integrado destes dois sistemas na prática clínica.(419)

O sistema Rai sofreu ligeiras alterações ao longo do tempo, tendo sido revisto, e determina que o estágio 0 é de baixo risco, sendo caracterizado pela presença de linfocitose (linfócitos com valor superior a  $15 \times 10^9/L$  no SP e mais de 40% de linfócitos na medula óssea). Os estádios I e II são de risco intermédio e são caracterizados pela linfocitose anteriormente descrita, associada a adenopatias e/ou hepato-esplenomegalia (Tabela 2). Os estádios III e IV são de alto risco e, além do que refere o risco intermédio, há a presença de anemia (Hb <11 g/dL ou hematócrito <33%) e trombocitopenia (plaquetas < $100 \times 10^9/L$ ), respetivamente.(85, 420, 421)

**Tabela 2. Classificação Rai e Binet e risco associado**

<b>Classificação de estádios</b>	<b>Estádios</b>		<b>Descrição</b>
Binet	A		<b>Menos de 3 áreas linfóides.</b>
	B		<b>3 ou mais áreas linfóides.</b>
	C		<b>Anemia e/ou trombocitopenia.</b>
RAI	<b>Classificação Original</b>	<b>Categorias de Risco (Revisão da Classificação)</b>	
	0	Baixo	<b>Linfocitose.</b>
	1	Intermédio	<b>Linfocitose + linfadenopatias.</b>
	2	Intermédio	<b>Linfocitose + hepatomegalia ou esplenomegalia ± linfadenopatia.</b>
	3	Alto	<b>Linfocitose + anemia ± linfadenopatia ou esplenomegalia.</b>
4	Alto	<b>Linfocitose + trombocitopenia ± anemia, esplenomegalia ou linfadenopatia.</b>	

## ***Evolução Clonal***

A aquisição de novas alterações citogenéticas no decurso da história natural da LLC é denominada evolução clonal.(328) Foi demonstrada a dinâmica da evolução clonal em 20-40% dos casos de LLC, ao observar-se diferenças entre os perfis citogenéticos ao diagnóstico e durante o *follow-up* (mais propriamente, na altura da primeira linha terapêutica e aquando da recidiva ou refratariedade da doença).(240, 241, 250, 280, 295, 302, 303, 322, 330, 348, 397, 422-434). A maioria destas alterações citogenéticas são de alto risco (deleções 17p e 11q) e a alteração citogenética de baixo risco mais frequente é a deleção 13q.(176, 328, 423, 435, 436) Quanto mais longo for o *follow-up*, maior a probabilidade de vir a desenvolver uma nova alteração citogenética.(330, 423)

A evolução clonal é um ponto-chave no desenvolvimento e recidiva da LLC. Baseado em estudos citogenéticos e moleculares, foi demonstrado que múltiplos clones podem ocorrer na LLC.(215, 295, 375, 428, 429, 437-441)

Existem dois padrões de evolução clonal na LLC.(295, 428, 429, 439-441) O primeiro é caracterizado por uma evolução linear, em que um único clone celular tem a ação de sucessivos eventos que desencadeiam a aquisição de mutações adicionais. Pelo contrário, o segundo padrão caracteriza-se por uma evolução ramificada, no qual dois ou mais subclones coexistem e evoluem paralelamente.

O estudo da sequência do genoma identificou dois tipos de mutações que surgem em momentos distintos da história natural da doença. Assim, os eventos genéticos iniciais são predominantemente clonais (heterozigotia del13q, +12, mutações *MYD88* e *NOTCH1*), enquanto os eventos que surgem no decorrer do *follow-up* são secundários, sendo essencialmente subclonais (mutações *TP53*, *ATM*, *SF3B1* e del13q homozigótica).(295) Deleções em 17p e 11q foram descritas como ocorrendo, tanto em eventos iniciais ou tardios da doença, o que pode explicar a heterogeneidade clínica destes subgrupos de doentes.(325, 442)

Através do desenvolvimento de subclones mais aptos a pressões ambientais seletivas, a doença pode evoluir com o tempo, podendo estes subclones ser substitutos clonais de um processo evolutivo, sendo considerados fatores de risco independentes de mau prognóstico, numa forma mais agressiva e/ou resistente da doença.(295, 443, 444) Não obstante, há autores que defendem que do ponto de vista clínico permanece controverso o impacto da evolução clonal na sobrevida.(328)

Foi também demonstrado que a quimioterapia favorece a evolução clonal, com o aparecimento e domínio de subclones através das mutações que ocorrem mais tardiamente (*TP53* ou *SF3B1*), com proliferação e substituição para outro subclone ao longo do tempo.(75, 295, 304, 333) É importante salientar que a própria terapêutica pode induzir mutações *de novo*, conferindo maior aptidão a determinados subclones.(445) No entanto, a completa substituição do novo subclone pode durar meses ou anos.(429)

O processo oposto da evolução clonal (flutuação clonal), definido pelo desaparecimento de um ou mais clones no *follow-up*, pode também ocorrer e ser visto em doentes tratados.(328, 423, 446)

Os conceitos de equilíbrio, competição e evolução clonais foram evidentes em estudos longitudinais, avaliando o impacto de terapias citorreduzidoras.(295, 428, 429, 439-441)

### ***Transformação***

A transformação de LLC para um Linfoma não Hodgkin de células B foi inicialmente descrita por Richter (1928) e só com o passar do tempo o síndrome de Richter (SR) se tornou sinónimo de Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDCGB), Linfoma de Hodgkin (LH), LPL-B ou Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B).(447-451) Atualmente reflete o desenvolvimento de LDCGB em doentes com LLC ou LLC/LLPC.(367, 452, 453).

A incidência da transformação de Richter, a partir LLC/LLPC para LDCGB, varia entre 2 a 9%.(447, 449, 454-458) Esta incidência aumenta até aos 16,2% aos 10 anos.(457) O tempo mediano desde o diagnóstico de LLC/LLPC até à transformação de Richter é de dois a quatro anos, embora estes possam apresentar concomitantemente LLC/LLPC e Síndrome de Richter (SR).(322, 367, 453-455, 457, 459-461) As grandes células, características do SR, evoluem normalmente através de uma transformação de um clone celular de LLC, pela aquisição de novas alterações citogenéticas.(13) Em 60 a 100% dos casos com transformação de Richter, a LDCGB está clonalmente relacionada com a LLC.(349, 455, 462, 463)

A progressão para LPL-B é extremamente rara (82), (186, 196, 464), ocorrendo mais frequentemente em doentes com *IGHV* não mutado e presença da alteração citogenética +12.(186) Embora a maioria dos casos de transformação para LPL-B representarem a transformação de um único clone de LLC, há casos descritos em que os PL provinham de vários clones de células patológicas.(465) Pouco se sabe ainda acerca das alterações genéticas que estão na base fisiopatológica desta transformação, no entanto, há trabalhos que descrevem uma possível associação com a ocorrência de rearranjos *MYC*.(338)

### ***Evolução clonal e o seu papel na resistência à terapêutica***

A maioria dos doentes com LLC responde inicialmente à terapêutica, no entanto há casos de quimiorrefratariedade primária ou doentes que desenvolvem resistência a fármacos ao longo do tempo, tornando-os mais difíceis de tratar.(466, 467) Define-se resistência à terapêutica à falta de resposta ao tratamento ou recidiva em 6 meses.(468)

Muitos esforços têm sido feitos na tentativa de caracterizar a LLC o mais profundamente possível, de forma a tentar prever qual será a sua história natural, quais serão as melhores estratégias e abordagens terapêuticas que possam evitar um desfecho mais sombrio. No entanto, existem ainda muitas perguntas sem resposta, nomeadamente perceber qual a real importância das alterações citogenéticas detetadas ao diagnóstico *versus* alterações citogenéticas secundárias (adquiridas no decurso da doença).

Devido à constatação que o estudo citogenético é um válido preditor de gravidade da doença, recomenda-se a realização da caracterização citogenética imediatamente antes do início do tratamento.(201, 469)

A descoberta de subclones geneticamente distintos na altura do diagnóstico pode implicar propriedades de crescimento agressivo.(42, 440, 470) Torna-se, portanto, de vital importância identificar alterações moleculares de baixo grau, que possam predizer resistência à terapêutica, permitindo ajustar o tratamento em conformidade. O seguimento da heterogeneidade intratumoral, ao longo do tempo, pode fornecer informações críticas sobre a dinâmica clonal da LLC.(333)

O tratamento *standard* para a LLC em doentes jovens (idade inferior a 65 anos) e sem comorbilidades é baseado na fludarabina-ciclofosfamida ou fludarabina-ciclofosfamida/rituximab (R-FC). Do total de indivíduos que são resistentes à fludarabina, 45% apresentam a deleção 17p13 ou mutações no gene *TP53*.(285, 304, 308, 471) Doentes com del17p parecem também ter resistência a regimes de quimioterapia baseados em agentes alquilantes e/ou análogos da purina.(313, 472) Por outro lado, estes doentes podem responder a terapêuticas com alemtuzumab, podendo estar combinado com outros agentes anti-leucémicos.(473, 474) A presença de mutações em *TP53* prevê, de uma forma clara, uma má resposta à quimioterapia de primeira linha. Mais recentemente, alguns autores defendem que doentes com mutação *TP53* subclonal respondem melhor à terapêutica com inibidores-alvo (por exemplo ibrutinib e idelalisib).(467, 475, 476)

Dos restantes 55% de doentes com resistência à fludarabina, cerca de 20% terão a alteração citogenética del11q. De facto, doentes com esta alteração citogenética apresentam uma má resposta a quimioterapia baseada em fludarabina e agentes alquilantes, pelo que esta alteração citogenética associa-se a progressão da doença e menor sobrevida.(75, 203, 329, 349, 363, 477) A refratariedade à terapêutica com fludarabina parece estar também associada a doentes com mutações recorrentes nos genes *NOTCH1*, *SF3B1* e *BIRC3*.(202, 203, 205, 285, 303, 345-348, 350, 363, 432)

Também se verificou a ocorrência de resistência a terapêuticas inibidoras do BCR, nomeadamente ao ibrutinib (inibidor da tirosina quinase de Bruton).(478) Esta resistência está ligada a mutações ocorridas na tirosina quinase de Bruton e/ou PLCy2.(440, 441, 478-482)

### ***Carcinomas secundários***

O risco de desenvolvimento de carcinomas secundários em doentes com LLC tratados segundo protocolo R-FC é 2,38 vezes mais elevado, comparativamente à população geral.(483)

## Objetivo do estudo

A detecção de alterações citogenéticas recorrentes tem sido de extrema relevância para o esclarecimento da heterogeneidade clínica da LLC, tendo as deleções 11q, 13q, 17p e a trissomia 12 valores de prognóstico conhecidos, desempenhando importantes papéis na patogénese e evolução da LLC.

Numa população de doentes com LLC pretendeu-se analisar o impacto da presença ou ausência das alterações citogenéticas trissomia do cromossoma 12, deleção 13q14, 11q22, 17p13 (presentes ao diagnóstico) nas características demográficas sexo e idade; nos parâmetros hematológicos leucócitos, linfócitos, hemoglobina, plaquetas e prolinfócitos; nos parâmetros bioquímicos  $\beta$ 2-M e LDH; na presença das comorbilidades AHAI, TI e AEP; nos estádios Rai; na sobrevida livre de terapêutica e sobrevida global.

Pretendeu-se analisar o impacto da aquisição destas alterações citogenéticas no decurso da doença, para as características atrás referidas.

Analisar a variação de valores nos parâmetros hematológicos e bioquímicos atrás referidos, entre o momento do diagnóstico e no momento anterior à terapêutica de 1ª linha, assim como a variação dos estádios Rai. Por fim, analisar a frequência das alterações citogenéticas (deleção 11q22, 13q14, 17p13 e trissomia do cromossoma 12) adquiridas no decurso da doença.

## Material e métodos

Através de um estudo observacional, do tipo de cohort retrospectivo, analisaram-se 227 doentes diagnosticados com LLC, do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E., na altura do diagnóstico e durante o decurso da doença, no período de tempo compreendido entre Abril/1998 e Novembro/2015.

Do total dos doentes em estudo, 73 não possuíam alterações citogenéticas ao diagnóstico nem durante o decurso da doença, tendo os restantes 154 alterações citogenéticas na altura do diagnóstico. Destes últimos, 26 adquiriram alterações citogenéticas no decurso da doença (secundárias). Foram utilizados critérios de diagnóstico de *IWCLL* e estadiamento segundo classificação Rai.

Nos 227 doentes, obtiveram-se os dados relativos à idade, sexo, valor de leucócitos, de linfócitos, da hemoglobina, das plaquetas, de prolinfócitos, da  $\beta 2$ -microglobulina, da lactato desidrogenase, a presença de hipogamaglobulinémia e/ou de comorbilidades autoimune, estágio Rai e a presença das alterações citogenéticas trissomia do cromossoma 12, deleção 11q22, deleção 17p13 e deleção 13q14. Com base nestas alterações citogenéticas os doentes foram divididos em 5 grupos: 1- sem alterações citogenéticas; 2- com alteração citogenética de bom prognóstico (deleção 13q14); 3- com alteração citogenética de prognóstico intermédio (trissomia do cromossoma 12); 4- com alterações citogenéticas de mau prognóstico (deleção 17p13 e/ou 11q22); 5- com aquisição de alterações citogenéticas no decurso da doença (secundárias) deleções 13q14, 17p13, 11q22 e/ou trissomia 12. Foi ainda determinada a sobrevida livre de terapêutica e a sobrevida global nos cinco grupos.

A caracterização da população obtida encontra-se descrita na Tabela 3.

**Tabela 3. Caracterização da população com base na presença/ ausência e tipo de alterações citogenéticas, relativamente ao número de doentes (N), percentagem (%), rácio quanto ao sexo (homens:mulheres) e idade média ao diagnóstico (anos).**

Grupos	LLC sem alterações citogenéticas	LLC com alteração citogenética de bom prognóstico	LLC com alteração citogenética de prognóstico intermédio	LLC com alterações citogenéticas de mau prognóstico	LLC com aquisição de alterações citogenéticas secundárias
<b>N</b>	73	58	37	59	26
<b>Percentagem (%)</b>	32,2%	25,6%	16,3%	26,0%	11,4%
<b>Rácio Sexo n (Homens:Mulheres)</b>	1,2:1 (40:33)	1,5:1 (35:23)	0,85:1 (17:20)	1,8:1 (38:21)	1:1 (13:13)
<b>Idade ao diagnóstico (anos) (<math>\bar{x} \pm DP</math>)</b>	65,6 $\pm$ 12,1	70,0 $\pm$ 9,4	70,9 $\pm$ 10,0	68,2 $\pm$ 9,9	65,1 $\pm$ 10,6

## Tratamento estatístico

Foi utilizado o programa IBM SPSS *Statistics* 21 para analisar estatisticamente os dados previamente recolhidos. Foram aplicadas medidas de estatística descritiva, tais como medidas de tendência central de dispersão, bem como medidas gráficas, como diagramas de extremos e quartis, de dispersão e gráficos de barras.

Foram utilizados os métodos t-Student para amostras independentes e amostras emparelhadas, Wilcoxon, Qui-Quadrado da Independência, Kaplan-Meier e as estatísticas para as diferenças de sobrevivência entre os grupos log-Rank e ANOVA a um fator para amostras independentes. Foram utilizados os testes Levene para avaliar a homogeneidade de resultados entre grupos de doentes com LLC e, dependente deste resultado, foi usado o teste ANOVA a um fator e teste robusto para as médias Welch. Por fim, foram utilizados os testes de comparações múltiplas Games-Howell e BonFerroni.

## Resultados

### Caracterização da população geral

Nos 227 doentes estudados a idade média ao diagnóstico de LLC foi de 68,3 anos, num intervalo compreendido entre os 35 e 95 anos, observando-se o maior número de casos entre os 59 e 78 anos. (Figura 1)

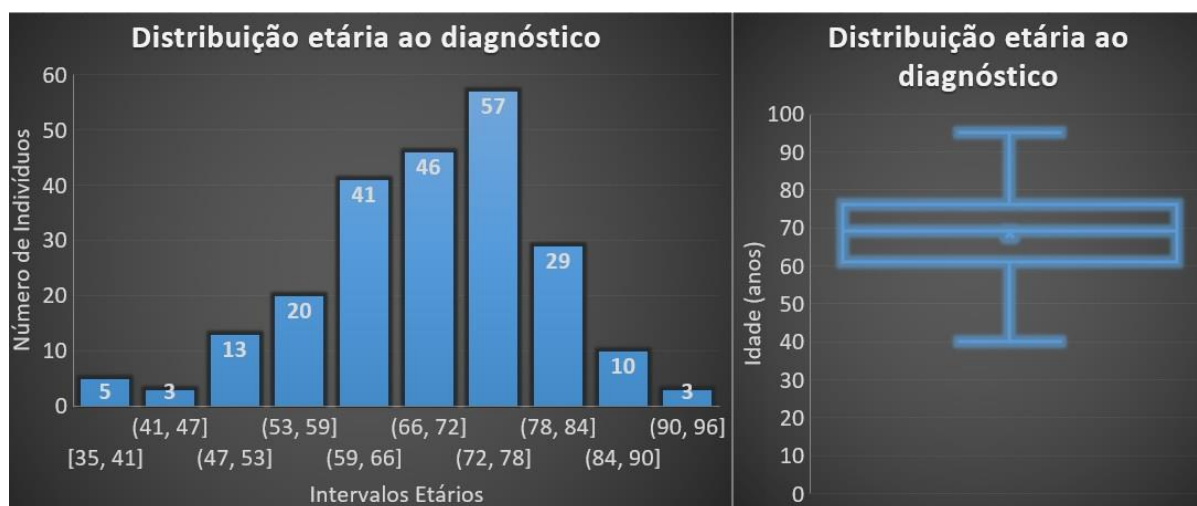


Figura 1 - Distribuição etária dos doentes com LLC.

Quanto ao género, 57% dos doentes estudados são homens (n=130) e 43% são mulheres (n=97). O sexo masculino tem uma média de idades ao diagnóstico de 67,0 anos e as mulheres de 69,8 anos e um ratio H:M=1,34:1. Esta distribuição etária por sexo encontra-se representada na Figura 2.

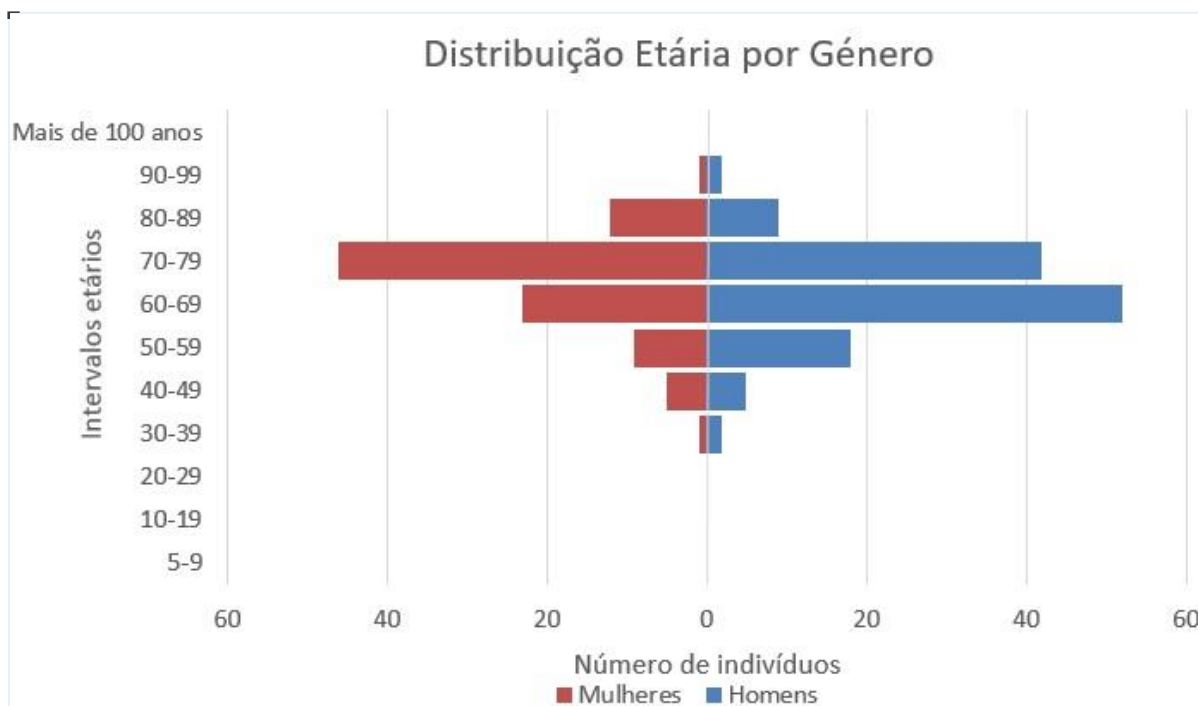


Figura 2 - Distribuição etária por sexo.

O universo de doentes com LLC que entrou neste estudo foi dividido em 5 grupos, dependendo da presença/ausência e tipo de alterações citogenéticas na altura do diagnóstico e, no caso de as possuírem, do prognóstico associado a cada uma delas. O quinto grupo é constituído por doentes que no decurso da doença adquiriram novas alterações citogenéticas. Assim sendo, foram definidos os seguintes grupos: 1- Grupo de doentes sem alterações citogenéticas (grupo controlo); 2- Grupo de doentes com alteração citogenética de bom prognóstico (deleção 13q14); 3- Grupo de doentes com alteração citogenética de prognóstico intermédio (trissomia do cromossoma 12); 4- Grupo de doentes com alterações citogenéticas de mau prognóstico (deleção 11q22 e/ou 17p13); 5- Grupo de doentes com alterações citogenéticas secundárias (aquisição de, pelo menos, uma das alterações citogenéticas atrás referidas, no decurso da doença).

Após esta divisão foi possível verificar que, ao diagnóstico, 67,8% dos doentes tinham alterações citogenéticas.

**Tabela 4. Caracterização da população com base na presença/ ausência e tipo de alterações citogenéticas, relativamente ao número de doentes (N), percentagem (%), rácio quanto ao sexo (homens:mulheres) e idade média ao diagnóstico (anos).**

<b>Grupos</b>	<b>LLC sem alterações citogenéticas</b>	<b>LLC com alteração citogenética de bom prognóstico</b>	<b>LLC com alteração citogenética de prognóstico intermédio</b>	<b>LLC com alterações citogenéticas de mau prognóstico</b>	<b>LLC com aquisição de alterações citogenéticas secundárias</b>
<b>N</b>	73	58	37	59	26
<b>Percentagem (%)</b>	32,2%	25,6%	16,3%	26,0%	11,4%
<b>Rácio Sexo n (Homens:Mulheres)</b>	1,2:1 (40:33)	1,5:1 (35:23)	0,85:1 (17:20)	1,8:1 (38:21)	1:1 (13:13)
<b>Idade ao diagnóstico (anos) (<math>\bar{x} \pm DP</math>)</b>	65,6 $\pm$ 12,1	70,0 $\pm$ 9,4	70,9 $\pm$ 10,0	68,2 $\pm$ 9,9	65,1 $\pm$ 10,6

Nestes cinco grupos foram avaliados parâmetros hematimétricos, como o valor de leucócitos, de linfócitos, de prolinfócitos, de hemoglobina e das plaquetas, assim como os parâmetros bioquímicos  $\beta$ 2-M e LDH em dois momentos: ao diagnóstico (T0) e antes de iniciar terapêutica de 1ª linha (T1).

- **Comparação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos entre os 5 grupos**

No momento do diagnóstico (T0), obteve-se variação de valores estatisticamente significativa entre os 5 grupos para o parâmetro analítico Prolinfócitos ( $p=0,001$ ). No momento anterior ao início da terapêutica de 1ª linha (T1), obtiveram-se variações de valores estatisticamente significativas para os parâmetros analíticos: Leucócitos ( $p<0,001$ ), Linfócitos ( $p<0,001$ ), Hemoglobina ( $p=0,034$ ), Plaquetas ( $p=0,003$ ),  $\beta$ 2-M ( $p=0,045$ ), LDH ( $p<0,006$ ) e Prolinfócitos ( $p<0,001$ ). (Tabela 5)

Após realizar a comparação entre grupos observou-se, na altura do diagnóstico (T0): um aumento estatisticamente significativo do valor de prolinfócitos no grupo com aquisição de alterações citogenéticas no decurso da doença, quando comparado com o grupo sem alterações citogenéticas,

assim como quando comparado com o grupo com alteração citogenética de bom prognóstico. (Tabela 5 e Figura 5).

Antes do início da terapêutica de primeira linha (T1), observou-se: um aumento estatisticamente significativo do valor de leucócitos e de linfócitos no grupo com aquisição de alterações citogenéticas no decurso da doença e no grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico, quando comparados com o grupo sem alterações citogenéticas (Tabela 5 e Figura 3); uma diminuição estatisticamente significativa do valor de hemoglobina no grupo com alteração citogenética de prognóstico intermédio, quando comparados com o grupo sem alterações citogenéticas (Tabela 5 e Figura 4); uma diminuição estatisticamente significativa do valor de plaquetas no grupo com aquisição de alterações citogenéticas no decurso da doença e no grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico, quando comparados com o grupo com alteração citogenética de bom prognóstico; um aumento estatisticamente significativo do valor de  $\beta_2$ -M no grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico, quando comparado com o grupo sem alterações citogenéticas; um aumento estatisticamente significativo do valor de LDH no grupo com alteração citogenética de prognóstico intermédio, comparativamente o grupo sem alterações citogenéticas; um aumento estatisticamente significativo da percentagem de prolinfócitos no grupo com aquisição de alterações citogenéticas no decurso da doença e no grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico, quando comparados com o grupo sem alterações citogenéticas, assim como quando comparado com o grupo com alteração citogenética de bom prognóstico (Tabela 5 e Figura 5).

**Tabela 5. Valores hematimétricos e bioquímicos nos 5 grupos de LLC, ao diagnóstico (T0) e no momento anterior à terapêutica de 1ª linha (T1)**

<b>Grupos</b>	LLC sem alterações citogenéticas	LLC com alteração citogenética de bom prognóstico	LLC com alteração citogenética de prognóstico intermédio	LLC com alterações citogenéticas de mau prognóstico	LLC com aquisição de alterações citogenéticas secundárias	
<b>Leucócitos</b> em T0 ( $\times 10^9/L$ ) ( $\rho$ )	26,38±28,27	33,88±64,89	35,95±48,73	47,09±61,22	45,60±49,61	.
<b>Leucócitos</b> em T1 ( $\times 10^9/L$ ) ( $\rho$ )	39,59±37,60 <b>d)</b>	57,27±71,95 <b>d)</b>	57,21±63,02 <b>d)</b>	95,13±81,05 <b>b) d)</b>	95,21±89,42 <b>b) d)</b>	a) ** ***
<b>Linfócitos</b> em T0 ( $\times 10^9/L$ ) ( $\rho$ )	20,84±26,36	28,64±64,06	27,13±35,01	36,01±37,04	36,20±40,08	.
<b>Linfócitos</b> em T1 ( $\times 10^9/L$ ) ( $\rho$ )	33,90±36,02 <b>d)</b>	50,58±71,09 <b>d)</b>	47,18±53,62 <b>d)</b>	82,13±66,82 <b>b) d)</b>	85,41±83,80 <b>b) d)</b>	a) ** ***
<b>Hb</b> em T0 (g/Dl) ( $\rho$ )	13,29±2,18	13,35±1,97	12,85±1,67	12,93±2,53	13,50±1,53	* ****
<b>Hb</b> em T1 (g/dL) ( $\rho$ )	12,92±1,98 <b>d)</b>	12,46±2,38 <b>d)</b>	11,72±1,73 <b>b) d)</b>	11,78±2,44 <b>d)</b>	12,65±2,03 <b>d)</b>	a) * ****
<b>Plaquetas</b> em T0 ( $\times 10^9/L$ ) ( $\rho$ )	189,23±77,58	206,78±84,17	199,35±108,26	168,39±60,28	181,54±75,16	..
<b>Plaquetas</b> em T1 ( $\times 10^9/L$ ) ( $\rho$ )	174,42±80,45 <b>d)</b>	198,18±102,15	189,79±122,84	145,02±62,37 <b>c) d)</b>	131,81±74,37 <b>c) d)</b>	a) ** ***
<b><math>\beta</math>2-M</b> em T0 (mg/L) ( $\rho$ )	2,77±1,57	2,67±1,07	3,33±1,74	3,28±1,52	2,80±0,88	.
<b><math>\beta</math>2-M</b> em T1 (mg/L) ( $\rho$ )	2,84±1,66	3,39±2,18 <b>d)</b>	3,68±2,02 <b>d)</b>	3,74±1,70 <b>b) d)</b>	3,96±2,21 <b>d)</b>	a) * ***
<b>LDH</b> em T0 (U/L) ( $\rho$ )	285,18±163,34	296,93±163,49	392,28±227,76	350,26±314,8	267,00±96,36	..
<b>LDH</b> em T1 (U/L) ( $\rho$ )	346,41±168,48 <b>d)</b>	439,76±208,74 <b>d)</b>	539,14±276,47 <b>b) d)</b>	400,79±290,2	684,0±571,5	a) ** ***
<b>Prolinfócitos</b> em T0 (%) ( $\rho$ )	0,92±1,87	0,64±1,84	3,35±6,00	3,60±7,30	6,27±8,71 <b>b) c)</b>	a) ** ***
<b>Prolinfócitos</b> em T1 (%) ( $\rho$ )	1,58±4,48	1,11±2,32 <b>d)</b>	4,41±6,20 <b>d)</b>	5,62±8,01 <b>b) c) d)</b>	6,73±7,37 <b>b) c)</b>	a) ** ***

a) Valor de  $p < 0,050$ , entre os cinco grupos;

b) Valor de  $p < 0,050$ , comparativamente ao grupo LLC sem alterações citogenéticas;

c) Valor de  $p < 0,050$ , comparativamente ao grupo LLC com alterações citogenéticas de bom prognóstico;

d) Valor de  $p < 0,050$  entre o momento de diagnóstico e momento anterior à terapêutica de 1ª linha, no mesmo grupo LLC (Teste T-student);

\* - Teste ANOVA; \*\* - Teste Welch; \*\*\* - Teste de comparação Games-Howell; \*\*\*\* - Teste de comparação Bon Ferroni;

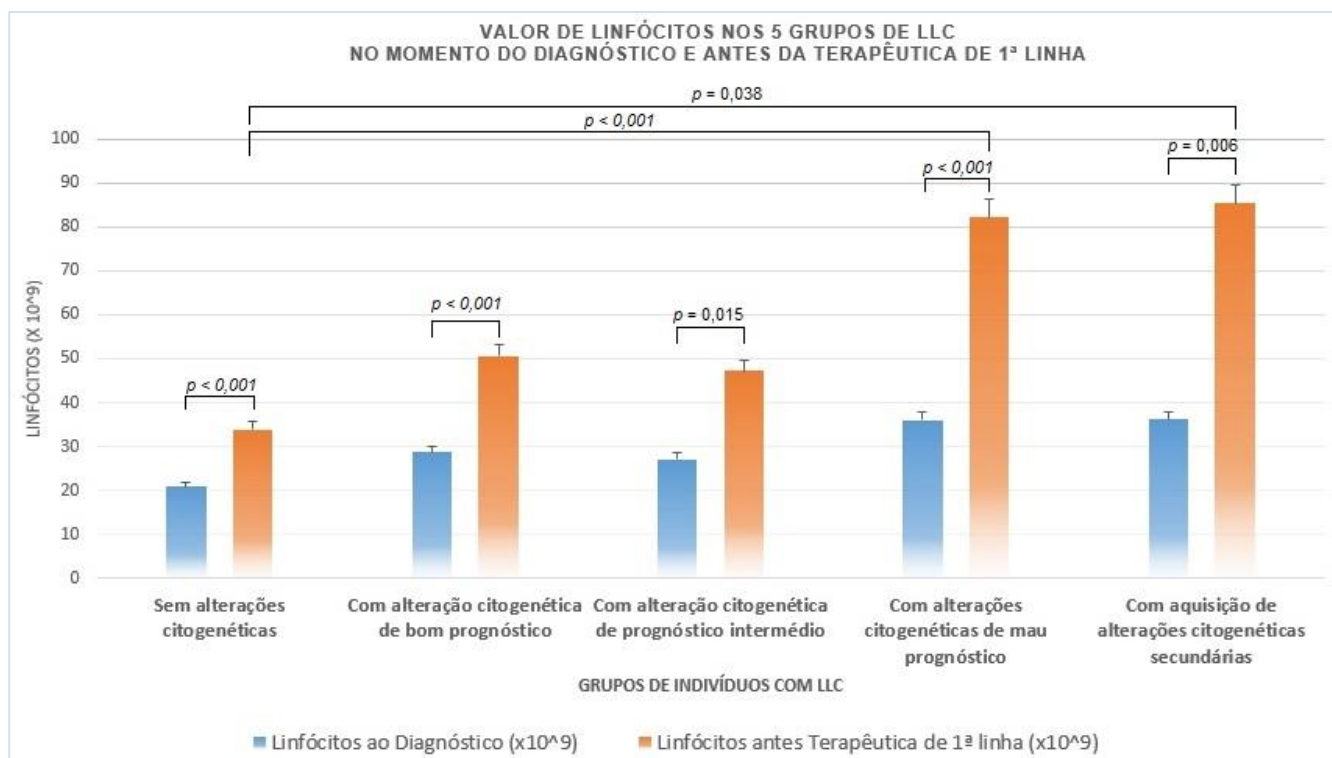
- **Comparação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos entre os momentos T0 e T1, nos 5 grupos**

No grupo sem alterações citogenéticas observou-se, entre os momentos T0 e T1, um aumento estatisticamente significativo do valor de leucócitos e de linfócitos e do valor da LDH; pelo contrário, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa do valor da hemoglobina e das plaquetas. (Tabela 5, figuras 3 e 4).

Tanto no grupo de doentes com alteração citogenética de bom prognóstico, assim como no grupo com alteração citogenética de prognóstico intermédio, observou-se um aumento estatisticamente significativo do valor de leucócitos, linfócitos,  $\beta$ 2-M, LDH e prolinfócitos e uma diminuição estatisticamente significativa do valor de hemoglobina.

No grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico, observou-se um aumento estatisticamente significativo do valor de leucócitos, linfócitos,  $\beta$ 2-M e prolinfócitos e uma diminuição estatisticamente significativa do valor da hemoglobina e das plaquetas.

No grupo com aquisição de alterações citogenéticas secundárias, entre T0 e T1, observou-se um aumento estatisticamente significativo do valor de leucócitos, linfócitos e  $\beta$ 2-M e uma diminuição estatisticamente significativa do valor da hemoglobina e das plaquetas. (Tabela 5, figuras 3 e 4)



**Figura 3 - Valor de Linfócitos nos 5 Grupos de LLC, em T0 e T1.**

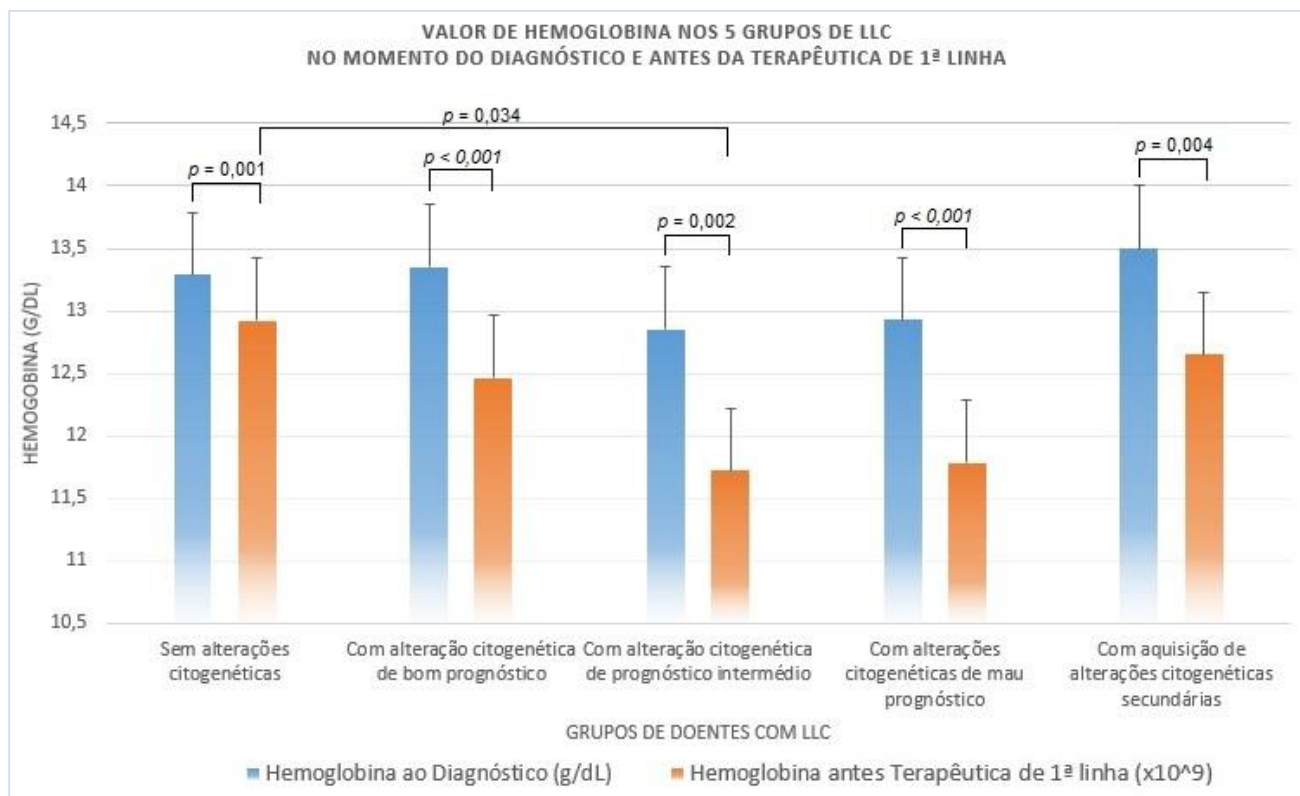


Figura 4 - Valor de Hemoglobina nos 5 Grupos de LLC, em T0 e T1.

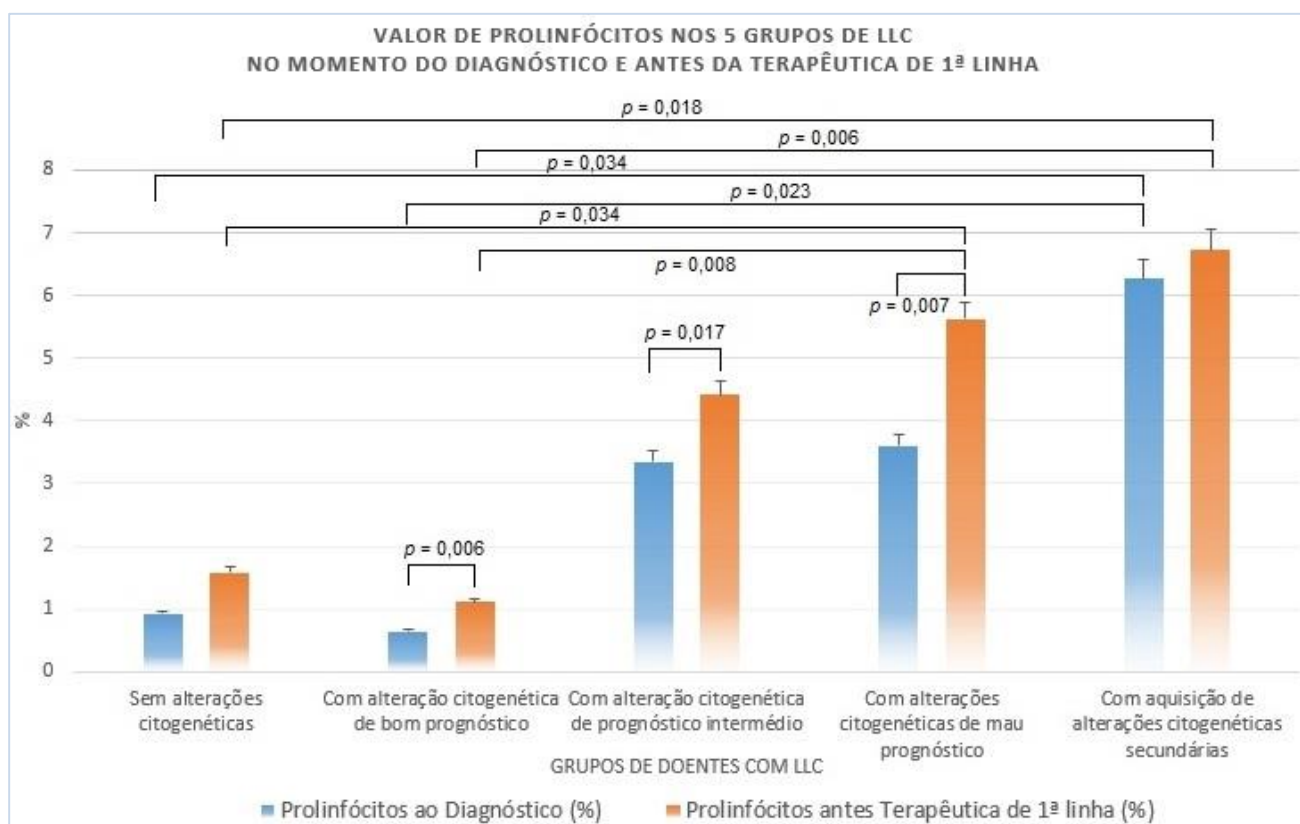


Figura 5 - Valor de Prolinfócitos nos 5 Grupos de LLC, em T0 e T1.

### Comorbilidades autoimunes

Dos 227 doentes estudados, apenas 15,8% (n=36) tinham comorbilidades autoimunes (AHAI, AEP ou TI). Como o valor de n é muito baixo, apenas se consideraram para o estudo estatístico 2 grupos: o grupo de doentes com LLC sem alterações citogenéticas e um novo grupo denominado grupo de doentes LLC com alterações citogenéticas, que englobava todos os grupos LLC com alterações citogenéticas.

- **Comparação da presença de comorbilidades autoimunes no total de indivíduos, nos 2 grupos**

Neste estudo a AHAI estava presente em 9,7% (n=22) dos 227 doentes. A minoria dos casos estava incluída no grupo de doentes sem alterações citogenéticas (13,6%, n=3), estando a maioria incluída no grupo de doentes com alterações citogenéticas (86,4%, n=19). O aumento observado neste grupo foi estatisticamente significativo ( $p=0,046$ ). (Figura 7)

Relativamente à aplasia eritroide pura, apenas 2,2% (n=5) tinham esta comorbilidade. Destes, 60% (n=3) estavam presentes no grupo de doentes sem alterações citogenéticas, estando os restantes 40% (n=2) presentes no grupo com alterações citogenéticas. Devido ao baixo valor de doentes a integrar a AEP, não foi possível efetuar a análise estatística e, desta forma, verificar se a diferença entre os 2 grupos foi estatisticamente significativa.

A trombocitopenia imune foi apenas observada em 4% dos doentes (n=9). Destes, a maioria integrava o grupo de doentes com alterações citogenéticas (55,6%, n=5), estando a minoria integrada no grupo de doentes sem alterações citogenéticas (44%, n=4) e 2,2% (n=5) estavam presentes nos grupos de LLC com alterações citogenéticas (Figura 6). Devido ao mesmo motivo apresentado na AEP, na TI também não foi possível efectuar análise estatística.

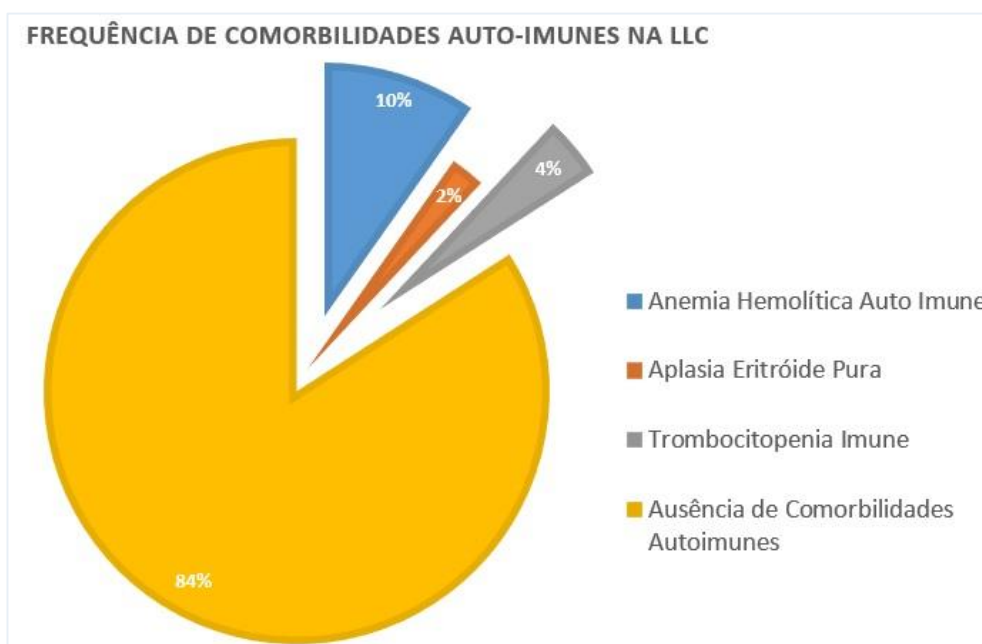


Figura 6 - Frequência de comorbilidades auto-imunes na LLC.

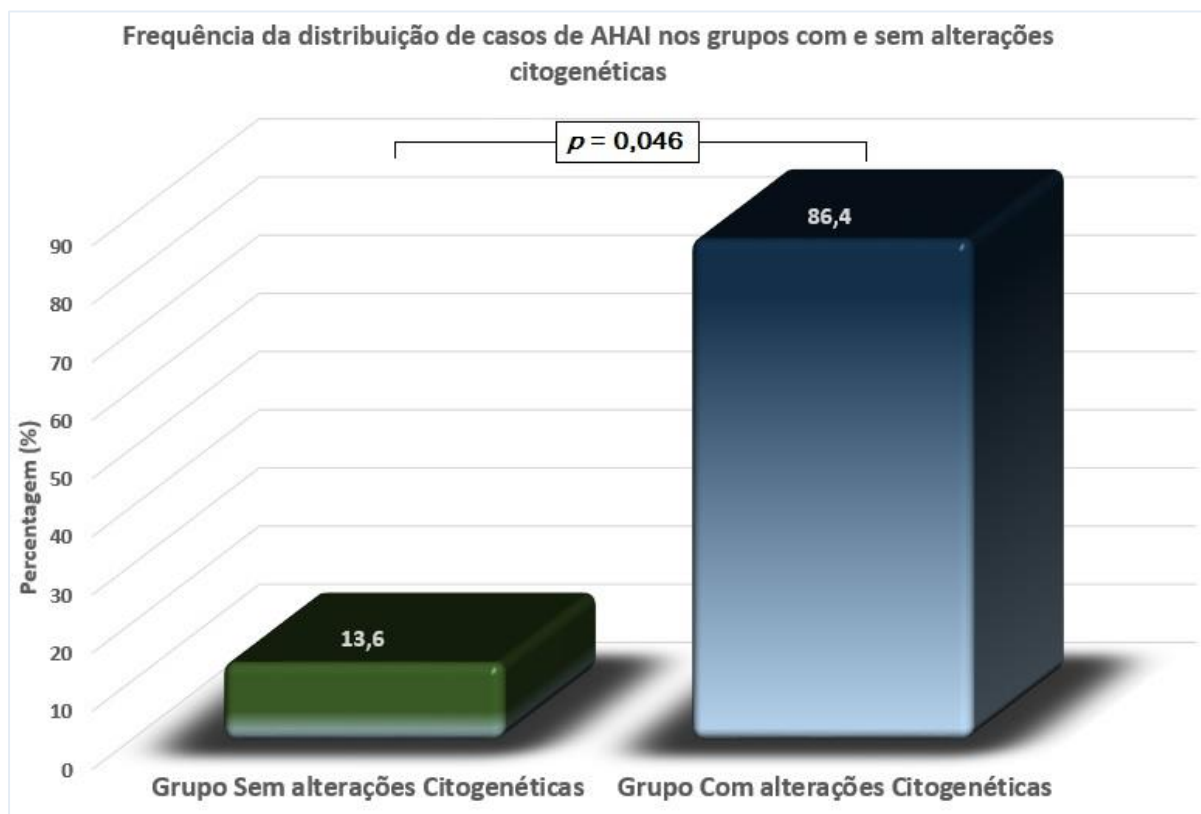


Figura 7 - Frequência da distribuição de casos de Anemia Hemolítica Autoimune, nos grupos de LLC com e sem alterações citogenéticas.

#### Hipogamaglobulinémia

A hipogamaglobulinémia estava presente em 13,7% (n=31) dos 227 doentes estudados. Como o valor de n é muito baixo, e à semelhança da análise feita para as comorbilidades auto-ímmunes, apenas se consideraram para o estudo estatístico o grupo sem alterações citogenéticas e o grupo com alterações citogenéticas.

- **Comparação presença da hipogamaglobulinémia no total de indivíduos, nos 2 grupos**

Do total de doentes com hipogamaglobulinémia (n=31), a maioria integrava o grupo com alterações citogenéticas (83,9%, n=26), estando os restantes integrados no grupo sem alterações citogenéticas (16,1%, n=5). A diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa ( $p=0,035$ ). (Figura 8)

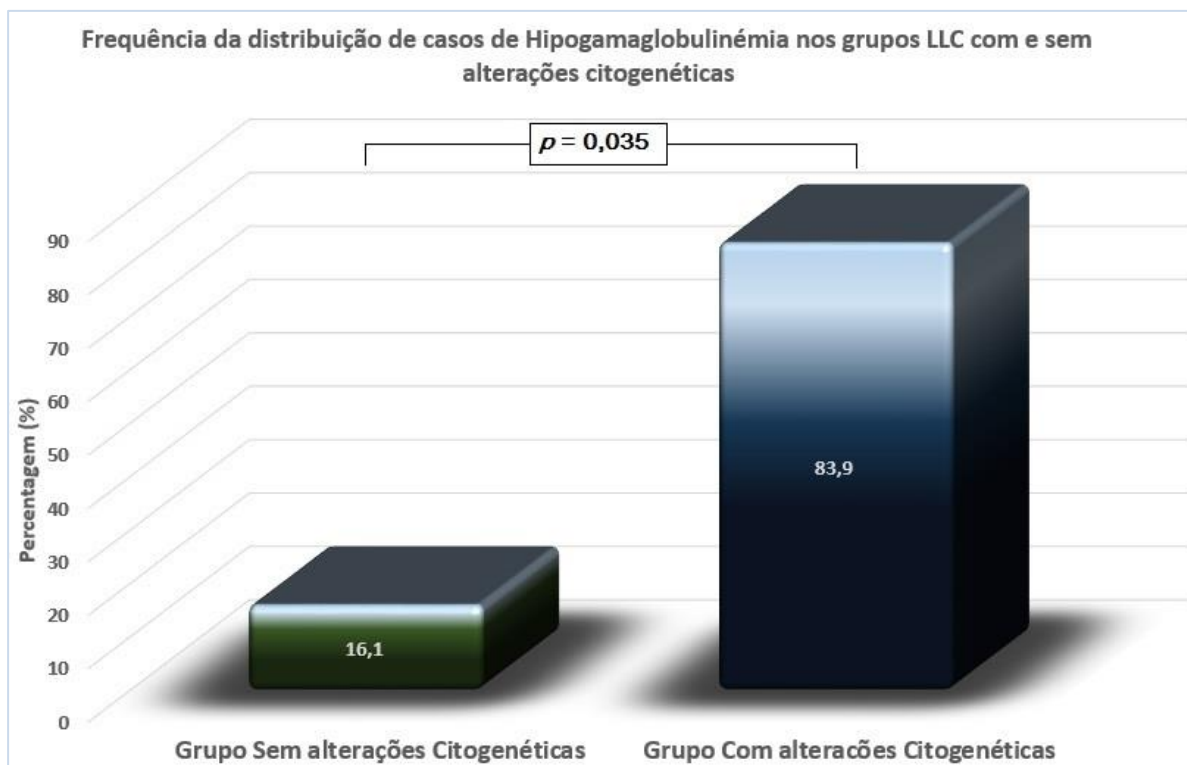


Figura 8 - Frequência da distribuição de casos de Hipogamaglobulinemia, nos grupos de LLC com e sem alterações citogenéticas.

#### Classificação de estádios Rai

- **Comparação dos estádios Rai entre os 5 grupos**

Obtiveram-se variações estatisticamente significativas entre os 5 grupos para os estádios Rai de baixo risco ( $p=0,001$ ) e de risco intermédio ( $p=0,045$ ), na altura do diagnóstico (T0); e para os estádios Rai de baixo e alto risco ( $p<0,001$ ), no momento anterior à terapêutica de 1ª linha (T1).

Após realizar a comparação entre grupos observou-se, na altura do diagnóstico (T0): um aumento estatisticamente significativo de doentes incluídos no estágio Rai de baixo risco no grupo LLC sem alterações citogenéticas, quando comparado com os grupos de intermédio e mau prognóstico e, ainda, com aquisição de alterações citogenéticas secundárias, obtendo todos eles  $p<0,050$ ; um aumento estatisticamente significativo de doentes, também incluídos no estágio Rai de baixo risco, no grupo LLC com alterações citogenéticas de bom prognóstico, quando comparado com os grupos de intermédio e mau prognóstico e com o grupo com aquisição de alterações citogenéticas secundárias ( $p<0,001$ ,  $p=0,004$  e  $p<0,001$ , respetivamente); um aumento de doentes incluídos no estágio Rai de alto risco no grupo LLC de mau prognóstico, quando comparado com o grupo com aquisição de alterações citogenéticas secundárias ( $p=0,050$ ). (Tabela 6)

Na altura anterior à terapêutica de 1ª linha (T1), observou-se um aumento estatisticamente significativo de doentes incluídos no estágio Rai de baixo risco no grupo LLC sem alterações citogenéticas, quando comparado com os grupos de intermédio e mau prognóstico e, ainda, com o

grupo com aquisição de alterações citogenéticas secundárias, obtendo todos eles  $p < 0,050$ ; um aumento de indivíduos incluídos no estágio Rai de alto risco no grupo LLC de mau prognóstico, quando comparado com o grupo sem alterações citogenéticas e com o grupo com aquisição de alterações citogenéticas secundárias ( $p=0,019$  e  $p=0,031$ , respetivamente). (Tabela 6)

- **Comparação dos estádios Rai entre os momentos T0 e T1, nos 5 grupos**

Em todos os grupos, exceto no grupo sem alterações citogenéticas, houve um aumento estatisticamente significativo de doentes ( $p < 0,050$ ) a integrarem o estágio Rai de alto risco, entre os momentos T0 e T1. (Tabela 6 e figuras 9 e 10)

**Tabela 6. Percentagem de doentes nos estádios Rai, para os 5 grupos de LLC**

Estádios Rai \ Grupos LLC	Sem alterações citogenéticas	Com alteração citogenética de Bom Prognóstico	Com alteração citogenética de prognóstico intermédio	Com alterações citogenéticas de mau prognóstico	Com alterações citogenéticas secundárias	P (entre os 5 grupos)
% Rai de Baixo Risco (T0) (n) <i>p value</i>	63,0 % (n=46) c) d) e)	67,3 % (n=37) c) d) e)	31,0 % (n=9)	36,4 % (n=16)	46,1 % (n=12)	a)
% Rai de Baixo Risco (T1) (n) <i>p value</i>	57,8 % (n=37) c) d) e)	52,7 % (n=29) c) d) e)	13,8 % (n=4)	20,5% (n=9)	20,8 % (n=5)	a)
		b)		b)	b)	
% Rai de Risco Intermédio (T0) (n) <i>p value</i>	19,2 % (n=14)	14,5 % (n=8)	41,4% (n=12)	29,5% (n=13)	30,8 % (n=8)	a)
% Rai de Risco Intermédio (T1) (n) <i>p value</i>	21,9 % (n=14) e)	12,7 % (n=7)	31,0 % (n=9)	15,9% (n=7)	16,7 % (n=4)	
% Rai de Alto Risco (T0) (n) <i>p value</i>	17,8 % (n=13)	18,2 % (n=10)	27,6 % (n=8)	34,1 % (n=15) e)	23,1 % (n=6)	
% Rai de Alto Risco (T1) (n) <i>p value</i>	20,3% (n=13)	34,5 % (n=19)	55,2 % (n=16)	63,6 % (n=28) f) e)	62,5 % (n=15)	a)
		b)	b)	b)	b)	

- a) Valor de  $p < 0,050$  entre os cinco grupos;
- b) Valor de  $p < 0,050$  entre o momento do diagnóstico e anterior à terapêutica de 1ª linha;
- c) Valor de  $p < 0,050$ , comparativamente ao grupo com alterações citogenéticas de prognóstico intermédio;
- d) Valor de  $p < 0,050$ , comparativamente ao grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico;
- e) Valor de  $p < 0,050$ , comparativamente ao grupo com aquisição de alterações citogenéticas no decurso da doença;
- f) Valor de  $p < 0,050$ , comparativamente ao grupo sem alterações citogenéticas.

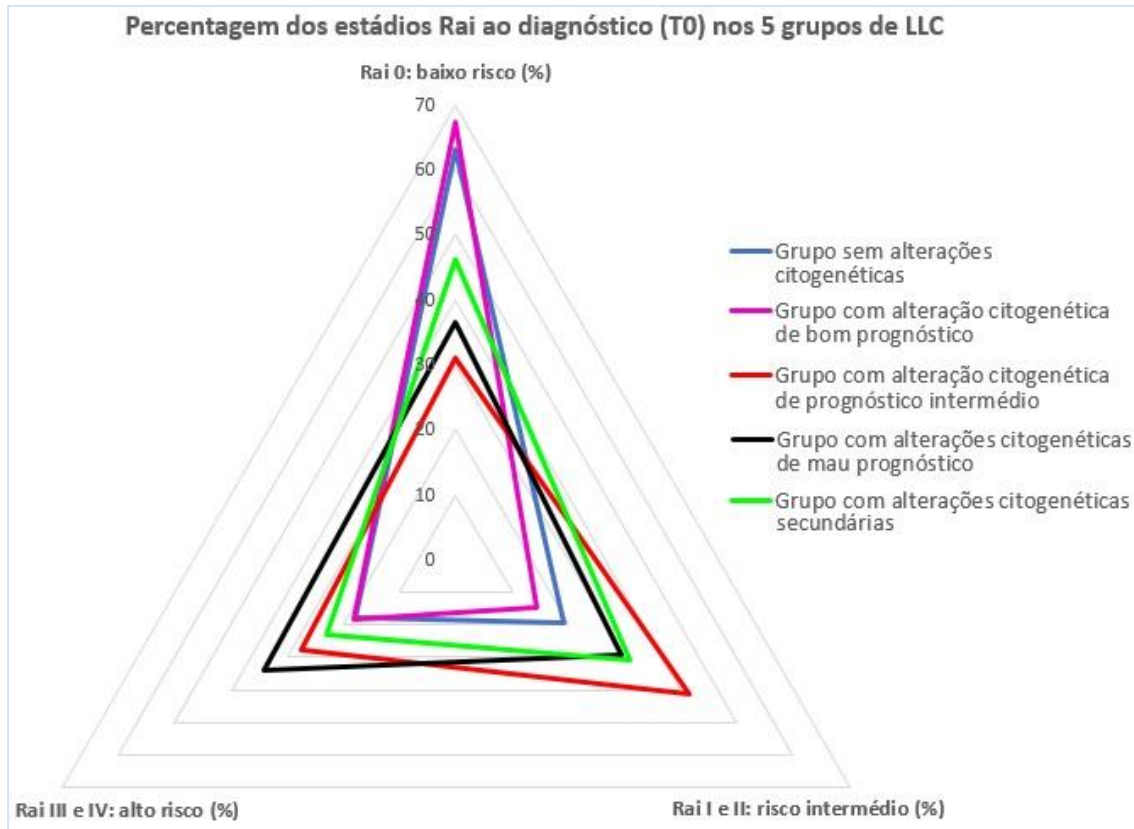


Figura 9 - Percentagem de doentes nos 3 estádios Rai ao diagnóstico, nos 5 grupos de LLC.

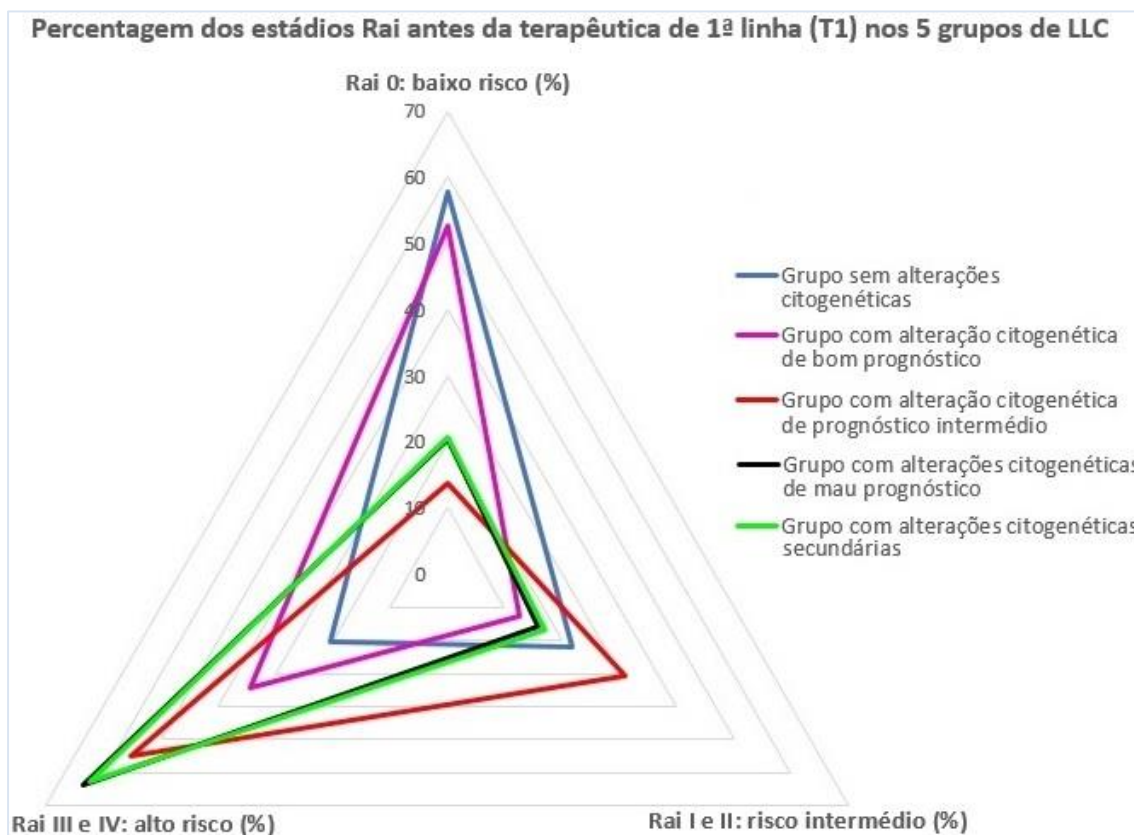


Figura 10 - Percentagem de doentes nos 3 estádios Rai antes da terapêutica de 1ª linha, nos 5 Grupos de LLC.

## Análises de sobrevivência

- **Sobrevida Livre de Terapêutica nos 5 grupos**

O valor da sobrevida livre de terapêutica (em meses) para os diferentes grupos de LLC e as respetivas curvas de sobrevida estão representadas na Tabela 7 e na Figura 11.

**Tabela 7. Sobrevida Livre de Terapêutica (meses)**

Grupo de doentes com LLC		Média			
		Sobrevida Estimada	Desvio Padrão	Intervalo Confiança 95%	
				Limite Inferior	Limite Superior
Sem alterações citogenéticas		123,2	7,1	109,2	137,2
Com alterações citogenéticas	De bom prognóstico	102,8	13,9	75,5	130,1
	De prognóstico intermédio	62,7	9,5	44,0	81,5
	De mau prognóstico	64,0	9,0	46,4	81,5
	Com aquisição de alterações citogenéticas no decurso da doença	49,7	8,0	33,9	65,4

Como expectável, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo sem alterações citogenéticas e os restantes grupos em estudo. Esta diferença traduz-se num gráfico de sobrevida livre de terapêutica em que, no grupo sem alterações citogenéticas, mais de 80% dos doentes ao fim de 150 meses continua livre de terapêutica (Figura 11).

Também se verificou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo com alteração citogenética de bom prognóstico e o grupo com aquisição de alterações citogenéticas no decurso da doença. Os restantes grupos apresentam semelhantes curvas de sobrevida livre de terapêutica.

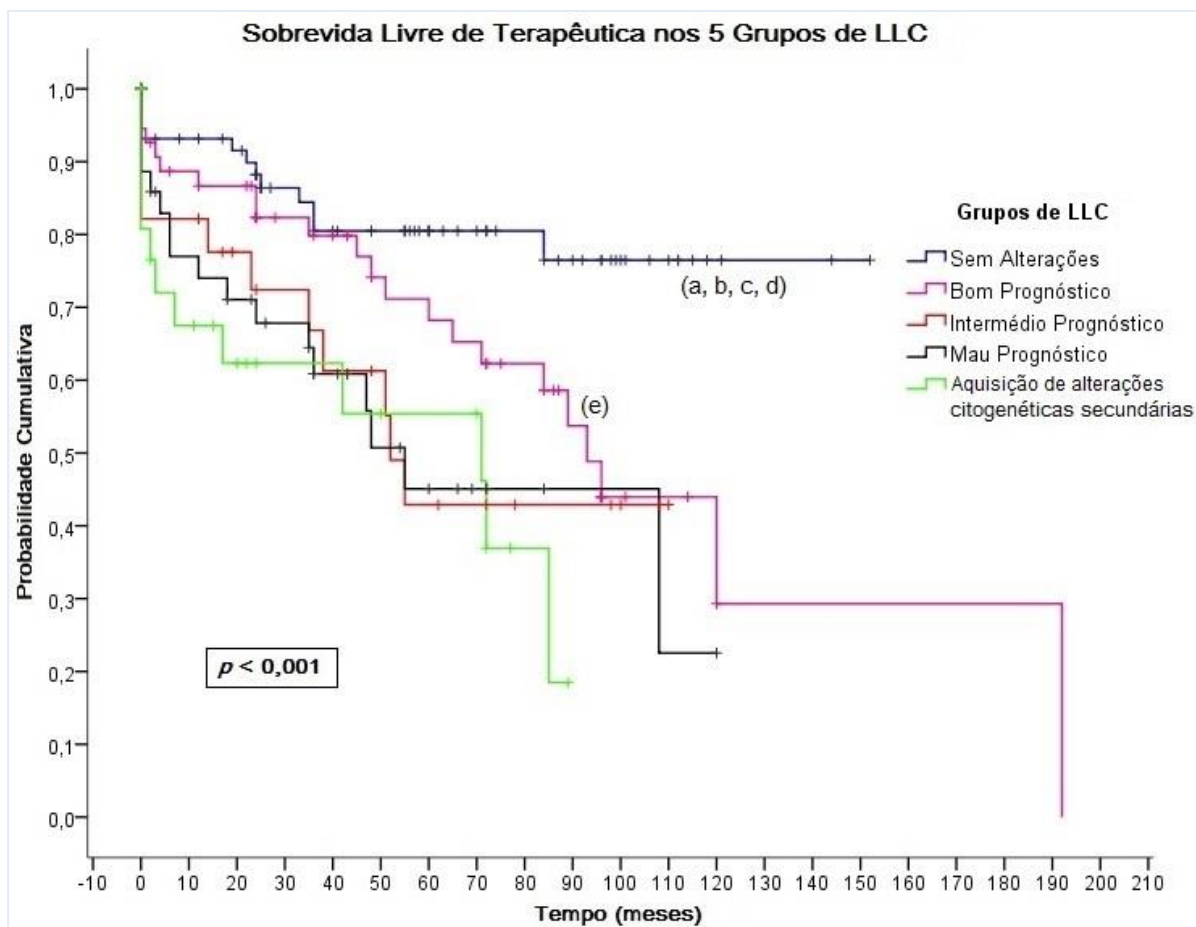


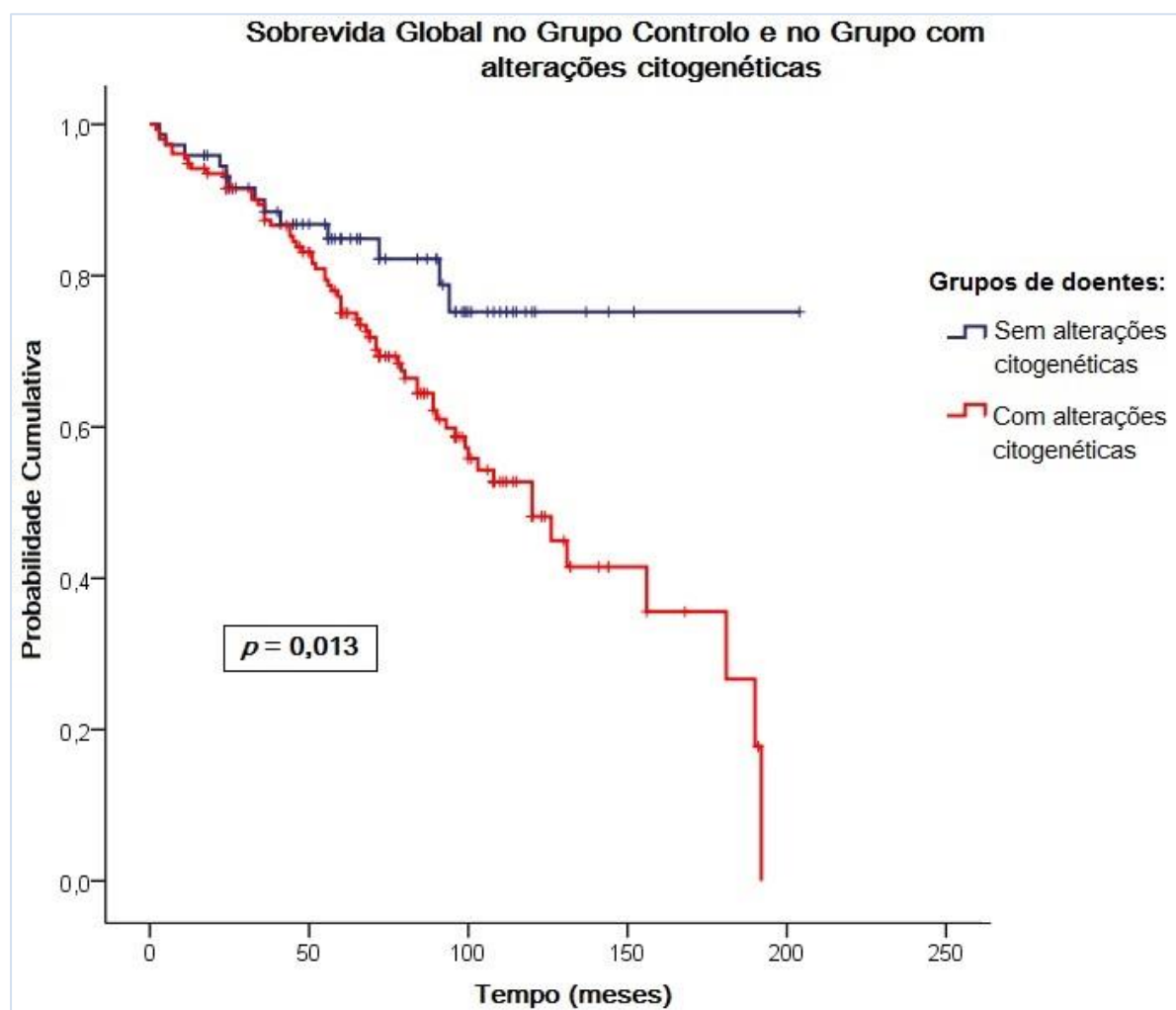
Figura 11- Sobrevida livre de terapêutica nos 5 grupos de doentes com LLC. a) Valor de  $p=0,029$ , comparativamente ao grupo com alteração citogenética de bom prognóstico; b) Valor de  $p=0,004$ , comparativamente ao grupo com alteração citogenética de prognóstico intermédio; c) Valor de  $p=0,001$ , comparativamente ao grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico; d) Valor de  $p<0,001$ , comparativamente ao grupo com aquisição de alterações citogenéticas secundárias; e) Valor de  $p=0,020$ , comparativamente ao grupo com aquisição de alterações citogenéticas secundárias.

- **Sobrevida Global**

Numa primeira análise da sobrevida global, os doentes foram divididos em 2 grupos: um sem alterações citogenéticas e outro com alterações citogenéticas ao diagnóstico. O primeiro grupo tem uma sobrevida global de 165,9 ±9,5 meses, descendo no segundo grupo para os 118,5 ±6,5 meses, sendo esta diferença estatisticamente significativa. (Tabela 8 e Figura 12)

**Tabela 8. Sobrevida Global dos grupos com e sem alterações citogenéticas (meses).**

Grupo de doentes com LLC	Média			
	Sobrevida Estimada	Desvio Padrão	Intervalo Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
Sem alterações citogenéticas	165,9	9,5	147,3	184,6
Com alterações citogenéticas	118,5	6,5	105,7	131,3



**Figura 12- Sobrevida global no grupo sem alterações citogenéticas e no grupo com alterações citogenéticas**

Posteriormente dividiram-se os doentes nos cinco diferentes grupos em estudo, analisando-se a sobrevida global para cada grupo. (Tabela 9 e Figura 13)

Como esperado, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo sem alterações citogenéticas e os grupos com alterações citogenéticas de prognóstico intermédio e de mau prognóstico. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os restantes grupos em estudo.

**Tabela 9. Sobrevida Global nos 5 Grupos de LLC (meses)**

Grupo de doentes com LLC		Média			
		Sobrevida Estimada	Desvio Padrão	Intervalo Confiança 95%	
				Limite Inferior	Limite Superior
Sem alterações citogenéticas		165,9	9,5	147,3	184,6
Com alterações citogenéticas	De bom prognóstico	128,4	10,6	107,6	149,3
	De prognóstico intermédio	103,8	13,2	77,9	129,6
	De mau prognóstico	109,7	14,2	81,8	137,5
	Com aquisição de alterações citogenéticas secundárias	123,4	11,8	100,3	146,6

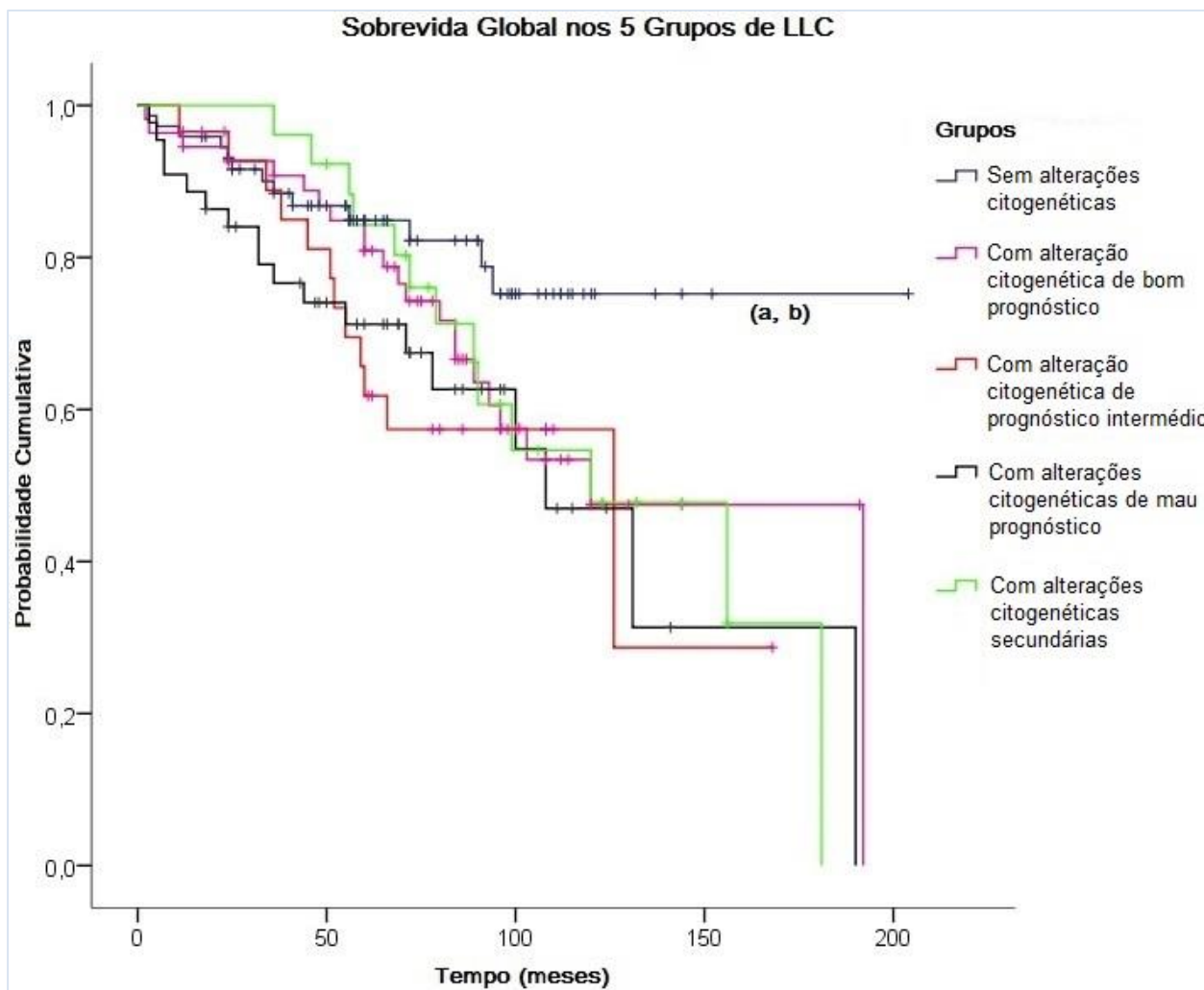


Figura 13 - Sobrevida Global nos 5 Grupos de LLC. a) Valor de  $p=0,024$ , comparativamente ao grupo com alteração citogenética de prognóstico intermédio; b) Valor de  $p=0,008$ , comparativamente ao grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico.

- **Análise das alterações citogenéticas adquiridas no decurso da doença**

Relativamente ao grupo de LLC com aquisição de alterações citogenéticas secundárias (grupo 5), observou-se que 29% dos doentes ( $n=11$ ) adquiriram a alteração citogenética del13q14. A média de sobrevida global para esta alteração citogenética é de  $105,2 \pm 16,67$  meses, não se verificando uma variação estatisticamente significativa, face à ausência desta alteração citogenética secundária ( $p=0,427$ ).

A alteração citogenética secundária mais frequente foi a del17p13, estando presente em 39,5% dos doentes ( $n=15$ ). Esta alteração citogenética obteve uma sobrevida global média de  $118,3 \pm 16,1$  meses, não se observando uma variação estatisticamente significativa entre a presença e a ausência desta alteração citogenética secundária ( $p=0,388$ ).

Foi ainda possível observar que 23,7% destes doentes (n=9) adquiriram a alteração citogenética secundária del11q22, cuja média de sobrevida é de 131 ±20,0 meses e, como nos casos anteriores, não houve uma variação estatisticamente significativa entre ter, ou não ter, esta alteração citogenética secundária ( $p=0,885$ ).

Relativamente à aquisição da trissomia do cromossoma 12, apenas 7,8% dos indivíduos (n=3) adquiriram esta alteração citogenética no *follow-up*. (Figura 14) Devido ao baixo número de doentes com a alteração citogenética secundária +12, não foi possível fazer a sua análise estatística.

A maioria (63,2%) das alterações citogenéticas adquiridas no decurso da doença é considerada de mau prognóstico (presença das deleções 11q e/ou 17p). (Figura 14)

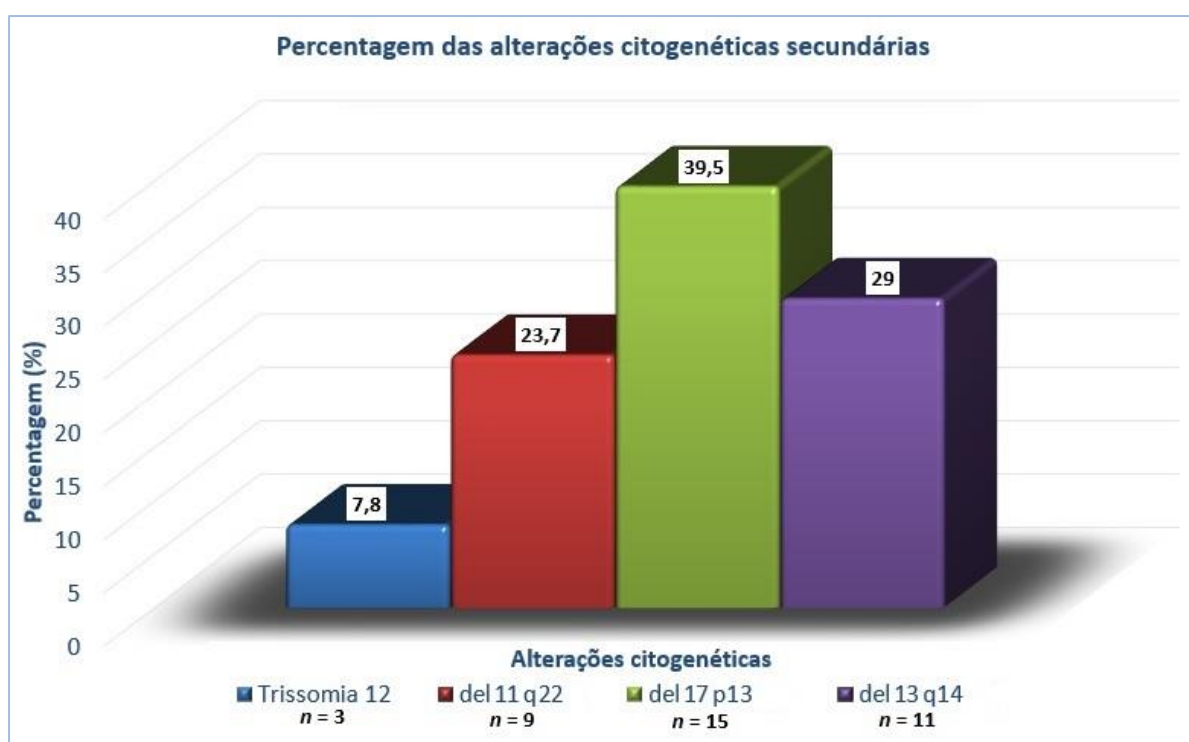


Figura 14 - Percentagem das alterações citogenéticas secundárias.

## Discussão

### Dados Demográficos

No presente estudo a idade média ao diagnóstico de LLC é de 68 anos, variando entre 65,1 e 70,9 anos, nos 5 grupos criados. Estes valores estão de acordo com vários autores, que confirmam que a média de idade ao diagnóstico se fixa entre os 65 e os 71 anos.(107, 379, 415, 484-487)

Apenas 6,17% e 9,69% dos doentes têm idade ao diagnóstico inferior a 50 anos e 55 anos (n=14 e n=22), respetivamente, estando de acordo com estudos efetuados na Europa e nos Estados Unidos da América, que concluíram que apenas 5 a 11% dos doentes com LLC tinham idades ao diagnóstico inferiores a 50-55 anos.(485, 488, 489) Outros estudos europeus indicam que 7 a 20% dos doentes com esta patologia têm idade inferior a 55 anos ao diagnóstico.(13, 373, 415, 490-492) Os valores obtidos neste estudo comprovam porque se considera a LLC uma doença do idoso, tendo uma incidência aumentada com o avançar da idade(104, 379, 485), sendo a idade jovem um fator independente de bom prognóstico, associada a maior sobrevida.(493) Não obstante, Parikh et al concluiu que doentes jovens com LLC, têm perfis moleculares de risco e clínica adversa (estádio Rai e *status* mutacional *IGHV*)(494), havendo outros estudos que concluíram que o facto de os doentes serem jovens ou idosos não tem correlação estatística com a sobrevida global do doente.(373, 491, 492, 495)

Quanto ao rácio homem/ mulher (H:M), este é quase sempre superior a 1 (nunca chegando a ser superior a 2). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos na bibliografia, que descrevem um predomínio do sexo masculino na LLC (tabela 4).(13, 96, 105, 484, 489). De salientar que no grupo de indivíduos com LLC com mau prognóstico, o rácio (H:M) foi de 1,8:1. Esta maior incidência pode ser devida pela presença da alteração citogenética del11q22 neste grupo, uma vez que Gribben JG, et al associou a presença desta alteração citogenética com o sexo masculino.(13)

Foi possível verificar que 68% dos doentes tinham alterações citogenéticas ao diagnóstico, estando próximo dos valores obtidos em vários estudos.(75, 217, 496)

### Parâmetros hematológicos

Os valores de leucócitos e linfócitos tiveram comportamentos semelhantes neste estudo, aumentando o seu valor absoluto ao longo do tempo (diminuindo apenas na aplicação de linhas terapêuticas), estando de acordo com vários autores.(373, 381, 386) Os valores mínimos foram verificados no grupo sem alterações citogenéticas. Bairey et al, já tinha demonstrado que a ausência de alterações citogenéticas conferia um menor valor de leucócitos ao diagnóstico, sendo este facto associado a melhor prognóstico.(493) Por sua vez, o valor máximo de leucócitos ao diagnóstico ( $47,09 \times 10^9/L$ ) foi verificado no grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico, estando de acordo com o estudo de Dohner et al.(75) O valor aumentado de leucócitos foi identificado por Krober et al, como um fator de mau prognóstico independente na LLC (226), e relacionado com menor sobrevida livre de terapêutica e sobrevida global.(373, 377, 381, 383, 386)

Relativamente ao valor de linfócitos, Aoun et al concluiu que valores absolutos de linfócitos  $\geq$  a  $30 \times 10^9/L$  ao diagnóstico, estavam associados a menor sobrevida global. No presente estudo, esses valores foram obtidos no grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico e no grupo com alterações citogenéticas secundárias, apresentando  $36,01 \times 10^9/L$  e  $36,20 \times 10^9/L$ , respetivamente.

O valor de hemoglobina e o número de plaquetas tiveram comportamentos semelhantes, havendo diminuição dos seus valores no decurso da doença (entre T0 e T1) em todos os grupos de LLC. Enquanto no parâmetro hemoglobina esta diminuição de valores foi estatisticamente significativa em todos os grupos, no parâmetro plaquetas esta diminuição foi estatisticamente significativa apenas para os grupos com alterações citogenéticas de mau prognóstico e secundárias. Del Guidice et al verificou que a diminuição significativa destes dois parâmetros estava associada a menor sobrevida livre de terapêutica.(497)

Ao diagnóstico, o grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico apresentava o valor mais baixo de plaquetas e, juntamente com o grupo com alteração citogenética de prognóstico intermédio, apresentavam os valores mais baixos de hemoglobina, contudo estes valores diminuídos não obtiveram variação estatisticamente significativa com os restantes grupos. O mesmo resultado foi obtido noutros estudos, mas com evidência estatística.(75, 498)

O grupo com alterações citogenéticas secundárias (em T0 e T1) e o grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico (em T1) estão estatisticamente associados a valores aumentados de prolinfócitos. (Figura 5 e tabela 5) Estudos previamente efectuados já tinham associado a presença e/ou valor aumentado de prolinfócitos com uma progressão mais rápida da doença, menor sobrevida, estadios de doença avançados, presença de alterações citogenéticas e anomalias da p53.(186, 191, 192, 464) É importante referir que o valor de prolinfócitos aumentou ao longo do tempo, em todos os grupos.

#### Parâmetros bioquímicos

Os valores de  $\beta$ 2-M e LDH aumentaram em todos os grupos, entre T0 e T1. O grupo com alteração citogenética de prognóstico intermédio foi o que apresentou maior valor de LDH ao diagnóstico, estando de acordo com o estudo realizado por Aoun et al.(499) Não obstante, Van Bocktaele et al, associou a presença de valores elevados de LDH com a presença da alteração citogenética del17p.(372)

Por sua vez, a presença de alterações citogenéticas de mau prognóstico foi estatisticamente associada a valores aumentados de  $\beta$ 2-M, no momento anterior à terapêutica de 1ª linha.

### Comorbilidades autoimunes

Neste estudo, a frequência das comorbilidades autoimunes foi de 15,8% (n=36). A ocorrência de AHAI foi a mais frequente (9,7%), seguida da Trombocitopenia Imune (4,0%) e por fim a Aplasia Eritróide Pura (2,2%).(Figura 6) Estas frequências estão em conformidade com a bibliografia existente, a qual refere que a AHAI é a doença autoimune mais frequente na LLC entando presente entre 5 a 10% dos casos, enquanto a Trombocitopenia Imune e Aplasia Eritróide Pura são mais raras.(125, 136, 141) No nosso estudo observou-se um aumento estatisticamente significativo da presença de AHAI nos doentes com alterações citogenéticas ( $p=0,046$ ). (Figura 7) A AHAI está normalmente presente nos estádios avançados da doença, como afirmam Hodgson et al e Barcelli et al.(127, 136)

### Hipogamaglobulinemia

Neste estudo a hipogamaglobulinemia está presente em 13,7% (n=31) dos doentes. Este valor é ligeiramente inferior ao detetado noutros estudos, no qual apontam que a hipogamaglobulinemia ocorre em 25% dos casos diagnosticados de LLC.(154) Foi possível observar que a ocorrência de hipogamaglobulinemia está estatisticamente associada com a presença de alterações citogenéticas em LLC ( $p=0,035$ ). (Figura 8) Num estudo efetuado em 2016, Andersen et al concluiu que a ocorrência de hipogamaglobulinemia é superior em doentes com a alteração citogenética del17p e quando presente ao diagnóstico de LLC, está associada com menor sobrevida global, com impactos negativos na sobrevida livre de terapêutica. (500)

### Estádios clínicos de Rai

Como esperado, verificou-se um aumento estatisticamente significativo de doentes incluídos no estágio Rai de baixo risco, no grupo LLC sem alterações citogenéticas e no grupo com alterações citogenéticas de bom prognóstico, quando comparado com os grupos de intermédio e mau prognóstico e ainda com o grupo com alterações citogenéticas secundárias, obtendo todos eles um valor de significância de  $p<0,050$ , estando de acordo com Shanafelt et al.(376). Entre o momento do diagnóstico e o momento terapêutica de 1ª linha, observou-se que estes dois grupos mantiveram praticamente as mesmas percentagens de doentes no estágio Rai de baixo risco, sendo por isso o grupo mais representativo.

No grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico, no momento anterior à terapêutica de 1ª linha, verificou-se um aumento de indivíduos no estágio Rai de alto risco, quando comparado com o grupo sem alterações citogenéticas e com o grupo com alterações citogenéticas secundárias. Neste grupo, a maioria dos doentes estavam no estágio Rai de alto risco, estando de acordo com os estudos de Dohner et al e Lai et al.(75, 501)

Apesar de no grupo de doentes com a alteração citogenética de prognóstico intermédio a maior percentagem de doentes (ao diagnóstico) estar integrado no estágio Rai de risco intermédio, não se obteve uma variação de doentes estatisticamente significativa com os restantes grupos, estando de acordo com o estudo de Aoun P, et al.(499)

Em todos os grupos, exceto no grupo sem alterações citogenéticas, (entre T0 e T1) houve um aumento estatisticamente significativo de doentes ( $p < 0,050$ ) a integrarem o estágio Rai de alto risco, comprovando que a LLC é uma doença caracterizada pela evolução, principalmente na presença de alterações citogenéticas de alto risco. (217, 472, 502, 503)

### Análises de sobrevivência

- *Sobrevida livre de terapêutica*

O presente estudo demonstra, ao contrário do estudo de Dohner et al, que a ausência de alterações citogenéticas confere maior sobrevida livre de terapêutica, comparativamente à presença da alteração de bom prognóstico del13q14. (75) No grupo de doentes sem alterações citogenéticas, a sobrevida livre de terapêutica média estimada foi de 123,2 meses, sendo este valor diferente do estudo efetuado por Dohner et al, que obteve 49 meses. (75) No grupo de doentes com a alteração citogenética de bom prognóstico, a sobrevida livre de terapêutica média estimada foi de 102,8 meses, próximos dos valores obtidos por Dohner et al (92 meses).

Além da ausência de alterações citogenéticas conferir maior sobrevida livre de terapêutica, comparativamente ao grupo com alterações citogenéticas de bom prognóstico, confere ainda maior sobrevida livre de terapêutica face a todos os grupos com alterações citogenéticas, sendo a variação de valores estatisticamente significativa. Observando o gráfico de Kaplan-Meier (Figura 11) foi possível verificar que a curva de sobrevida livre de terapêutica do grupo de doentes sem alterações citogenéticas, (por exemplo) entre o quinto e o vigésimo mês, não sofreu alterações, apresentando a melhor sobrevida livre de terapêutica de entre todos os grupos (95%, aproximadamente). A variação de sobrevida livre de terapêutica deste grupo, comparativamente aos 4 grupos com alterações citogenéticas, foi estatisticamente significativa sendo, por isso, possível afirmar que a ausência de alterações citogenéticas confere maior sobrevida livre de terapêutica e, por sua vez, a presença de alterações citogenéticas confere menor sobrevida livre de terapêutica.

De entre os grupos de doentes com alterações citogenéticas, foi possível determinar que a presença da alteração citogenética de bom prognóstico del13q14 confere melhor sobrevida livre de terapêutica, tendo uma variação de valores estatisticamente significativa comparativamente aos doentes com alterações citogenéticas secundárias ( $p = 0,020$ ). Observando a curva de Kaplan-Meier é possível extrapolar esta diferença, pois (por exemplo) ao vigésimo mês, no grupo com alteração citogenética de bom prognóstico, 85% dos casos encontravam-se livre de terapêutica, 77% dos casos no grupo com alteração citogenética de prognóstico intermédio, 73% no grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico e 63% no grupo com alterações citogenéticas secundárias.

No presente estudo, o grupo de doentes com a alteração citogenética de prognóstico intermédio e o grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico obtiveram uma sobrevida livre de terapêutica média estimada de 62,7 e 64,0 meses respetivamente. Estes resultados foram diferentes dos obtidos por Dohner et al, que obteve 33 meses de sobrevida livre de terapêutica no grupo com a alteração

citogenética de prognóstico intermédio e obtendo para as alterações citogenéticas de mau prognóstico del11q e del17p, sobrevida livre de terapêutica média de 13 e 9 meses, respetivamente.(75)

No grupo de doentes com alterações citogenéticas secundárias, a sobrevida livre de terapêutica média estimada foi de 49,7 meses, sendo a mais baixa obtida neste estudo. Este valor é, em parte, devido a alguns doentes deste grupo que começaram o tratamento de 1ª linha logo após o diagnóstico, o que explica a pior sobrevida livre de terapêutica no mês zero, comparativamente aos restantes grupos.

Estes dados evidenciam que a sobrevida livre de terapêutica nos doentes com LLC está dependente da presença e tipo de alterações citogenéticas, estando a sua presença associada a menor sobrevida livre de terapêutica e, pelo contrário, a sua ausência associada a maior sobrevida livre de terapêutica. Adicionalmente, a aquisição de alterações citogenéticas no decurso da doença confere pior sobrevida livre de terapêutica.

- *Sobrevida global*

Dividindo os doentes em apenas dois grupos (com e sem alterações citogenéticas), foi possível concluir que a presença de alterações citogenéticas confere menor sobrevida global (118,5 meses) e, por sua vez, a ausência de alterações citogenéticas confere maior sobrevida global (165,9 meses), sendo esta variação de valores estatisticamente significativa ( $p=0,013$ ) e estando de acordo com outros estudos publicados.(75, 89) No grupo sem alterações citogenéticas a sobrevida global aos 5 anos foi de 84% e aos 10 anos de 77%, tendo valor similar ao estudo de Rossi et al, aos 5 anos (sobrevida global de 86%), mas diferente aos 10 anos (sobrevida global de 12%).(241)

Analisando o gráfico de Kaplan-Meier, verifica-se que nos primeiros 50 meses os dois grupos têm comportamentos muito semelhantes, contudo, a partir do mês 50, as curvas de sobrevida afastam-se, apresentando o grupo sem alterações citogenéticas (por exemplo) no mês 94 uma probabilidade de sobrevida global de 75,2%, sendo este valor muito superior ao obtido no grupo com alterações citogenéticas (59,9%). (Figura 12)

Ao subdividir os doentes nos cinco grupos inicialmente definidos, verifica-se como esperado que o grupo sem alterações citogenéticas se mantém como o grupo com maior sobrevida global, contudo apenas obtendo variações de valor estatisticamente significativos, quando comparado com os grupos com alterações citogenéticas de prognóstico intermético e mau prognóstico ( $p=0,024$  e  $p=0,008$ , respetivamente). Observando o gráfico de Kaplan-Meier (Figura 13) é possível verificar que a curva de sobrevida do grupo de doentes sem alterações citogenéticas estabiliza e afasta-se das restantes a partir do nonagésimo quarto mês após o diagnóstico de LLC, mantendo uma sobrevida de 75%, enquanto os grupos com alterações citogenéticas têm valores de sobrevida inferiores a 60%.

Relativamente às curvas de sobrevida global dos grupos com alterações citogenéticas, estas têm comportamentos bastante semelhantes e, por isso, entre estes grupos nenhum tem variações de valor

estatisticamente significativos. O grupo com alteração citogenética de bom prognóstico apresentou o segundo maior valor de sobrevida global (128,4 meses), estando muito próximo do valor obtido por Dohner et al (133 meses).(75, 89, 504) Neste grupo, a sobrevida global aos 5 anos foi de 81% e aos 10 anos de 57%, em linha com as obtidas por Rossi et al, que apresentavam uma sobrevida global aos 5 anos de 87% e aos 10 anos de 69%.(241)

O grupo com alteração citogenética de prognóstico intermédio apresentou a pior sobrevida global (103,8 meses), estando de acordo com vários estudos, que obtiveram uma associação entre esta alteração citogenética e menor sobrevida livre de terapêutica e global.(89, 224, 504, 505) Neste grupo, a sobrevida global aos 5 anos foi de 62%, e aos 10 anos de 58%. Resultados similares foram obtidos por Rossi et al, com uma sobrevida global aos 5 anos de 78%, e aos 10 anos de 57%.(241)

O grupo com alterações citogenéticas de mau prognóstico apresentou a segunda menor sobrevida global (109,7 meses), estando de acordo com vários estudos, que apontam a del17p13 e a del11q22 como fatores de prognóstico independentes, apresentando menor sobrevida livre de tratamento e global.(75, 85, 89, 217, 284, 307, 330, 379, 397, 431, 471, 472, 502, 503, 506-510) Neste grupo, a sobrevida global aos 5 anos foi de 73% e aos 10 anos de 44%, estando próxima dos valores de Rossi et al, que refere que a presença da del17p13 tem uma sobrevida global de 51% aos 5 anos, e 29% aos 10 anos; e a alteração citogenética del11q22 de 66% aos 5 anos e 37% aos 10 anos.(241)

O grupo com alterações citogenéticas secundárias apresentou uma sobrevida global média de 123,4 meses, tendo aos 5 anos uma sobrevida de 83%, e aos 10 anos de 56%. A alteração citogenética secundária mais frequente foi a del17p13, seguida das alterações citogenéticas del13q14 e a del11q22, com percentagens de 39,5%, 29% e 23,7%, respetivamente, estando em linha com outros estudos publicados.(176, 295, 325, 328, 423, 435, 436, 442)

## Conclusão

O presente estudo visava analisar o impacto das alterações citogenéticas (deleções 13q14, 11q22, 17p13 e trissomia 12) nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, assim como na presença de comorbidades autoimunes, hipogamablobulinemia, sobrevida livre de terapêutica e global, subdivididas pelo grau de prognóstico associado.

Observou-se um ligeiro predomínio do sexo masculino na ocorrência da LLC.

Desde o diagnóstico até ao momento da terapêutica de 1ª linha, os valores de leucócitos e linfócitos aumentam, e os valores de hemoglobina diminuem de uma forma estatisticamente significativa, independentemente da presença ou tipo de alterações citogenéticas (deleções 13q14, 17p13, 11q22 e trissomia 12).

A ausência de alterações citogenéticas na LLC confere maior sobrevida livre de terapêutica e global. A presença da alteração citogenética de bom prognóstico (deleção 13q14) confere também maior sobrevida livre de terapêutica. Ambos os grupos estão associados a estágio Rai de baixo risco.

A presença de alterações citogenéticas está, por sua vez, estatisticamente associada à ocorrência de AHA1 e hipogamaglobulinemia.

As alterações citogenéticas de mau prognóstico (deleções 11q22 e 17p13) estão estatisticamente associadas a valores aumentados de leucócitos, linfócitos, prolinfócitos,  $\beta$ 2-Microglobulina e valores diminuídos de plaquetas no momento anterior à terapêutica de 1º linha. Estas alterações citogenéticas estão ainda associadas a estágio Rai de alto risco e a menor sobrevida livre de terapêutica e global.

A presença de alterações citogenéticas secundárias está estatisticamente associada a valores aumentados de prolinfócitos ao diagnóstico, assim como a valores aumentados de leucócitos, linfócitos, prolinfócitos e valores diminuídos de plaquetas, no momento anterior à terapêutica de 1ª linha. Estas alterações citogenéticas secundárias estão ainda associadas a menor sobrevida livre de terapêutica. A maioria das alterações citogenéticas adquiridas no decurso da doença (63,2%) são de mau prognóstico, sendo que a alteração citogenética secundária mais frequente foi a del17p13.

## Bibliografia

1. K G. Biology and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol Pol* 2010; 41: 433-440.
2. Wong DY SD. The interaction of cofilin with the actin filament. *J Mol Biol* 2011; 413: 97-105.
3. Munk Pedersenl RJ. Microenvironmental interations and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 2365-2372.
4. Gaidano G FR, Dalla-Favera. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2012; 122: 3432-3438.
5. Kikushige Y IF, Miyamoto T, Shima T, Urata S, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2011; 20: 246-259.
6. Calin GA DC, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(24):15524–15529.
7. Zenz T MD, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Rev Cancer* 2010;10(1):37-50.
8. Cimmino A ea. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13944-13949.
9. F C-C. Chronic lymphocytic leukemia: "Cinderella" is becoming a star. *Mol Med* 2009; 15: 67-69.
10. Garcia-Munonz R GV, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Ann Hematol* 2012; 91: 981-996.
11. Rosén A MF, Evaldsson C, Rosenquist R. Antigens in chronic lymphocytic leukemia - implications for cell origin and leukemogenesis. *Semin Cancer Biol* 2010; 20: 400-409.
12. Chiorazzi N FM. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 2011; 117: 1781-1791.
13. JG G. How i treat CLL up front. *Blood* 2010; 115(2): 187-97.
14. Hamblin TJ DZ, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more agresive form or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94(6):1848-54.
15. Damle RN WT, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94(6):1840-7.

16. Ibrahim S KM, Do KA, O'Brien S, Huh YO, et al. CD 38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98(1): 181.
17. Tobin G TU, Johnson A, et al. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99(6): 2262-2264.
18. Chevallier P PD, Avet-Loiseau H, Robillard N, Ifrah N, et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002; 116(1): 142.
19. Ghia P GG, Stella S, Gottardi D, Geuna M, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* 2003; 101(4): 1262.
20. Rosenwald A AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194(11): 1639-1646.
21. Klein U TY, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001; 194(11): 1625-1638.
22. Damle RN GF, Valetto A, Albesiano E, Fais F, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002; 99(11): 4087-4093.
23. Durig J NH, Huttmann A, Kruse E, Holter T, et al. Expression of ribosomal and translation-associated genes is correlated with a favorable clinical course in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 101(7): 2748.
24. Rai KR CN. Determining the clinical course and outcome in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348(18): 1797.
25. Guarini A GG, Mauro FR, Capello D, Mancini F, et al. Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotype and genotype features. *Blood* 2003; 102(3): 1035.
26. Gunnarsson R RR. New insights into the pathobiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematopathol* 2001; 4: 149-163.
27. Ranheim EA AG, Cocks BG, et al. Expression of CD27 and its ligand CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 1995; 85: 3556-3565.
28. Kulis M HS, Bibikova M, Queirós AC, Navarro A, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2012 Nov; 44(11): 1236-42.

29. Queirós AC VN, Clot G, Martinez-Trillos A, Kulis M, Navarro A, et al. A B-cell epigenetic signature defines three biologic subgroups of chronic lymphocytic leukemia with clinical impact. *Leukemia* 2015 Mar; 29(3) :598-605.
30. Klein U D-FR. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Rev Immunol* 2008; 8: 22-33.
31. Ghia P SK, Belessi C, et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007; 21(1): 1-3.
32. Dighiero G HT. Chronic lymphocytic leukemia.;*Lancet* 2008; 371:1017-1029.
33. Stevenson FK C-CF. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004; 103: 4389-4396.
34. Davids MS BJ. Targeting the B cell receptor pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* Epub 2012 May 23.
35. Deglesne PA CN, Letestu R, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap-70 expression. *Cancer Res* 2006;66:7158-7166.
36. Gobessi S LL, Longo PG, et al. ZAP-70 enhances B-cell receptor signaling in spite of absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B-cells. *Blood* 2006;109:2032-2039.
37. Petlickovski A LL, Li X, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005;105:4820-4827.
38. Huttmann A K-HL, Thomale J, et al. Gene expression signatures separate B-cell chronic lymphocytic leukaemia prognostic subgroups defined by ZAP-70 and CD38 expression status. *Blood* 2006;20:1774-1782.
39. Burger JA KT. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk Lymphoma* 2002;43:461-466.
40. Kofler DM BH, Mayr C, et al. Engagement of the B-cell antigen receptor (BCR) allows efficient transduction of ZAP-70 positive primary B-cells by recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* 2004;11:1416-1424.
41. Murray F DN, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 2008; 111(3): 1524-1533.
42. Chiorazzi N RK, Ferrarini M. Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352:804-15.

43. Ghia P ea. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005; 105: 1678-1685.
44. Stamatopoulos K BC, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007; 109(1): 259-270.
45. Messmer BT AE, Efremov DG, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a key role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2004; 200: 519-525.
46. Widhopf GF n, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipp TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood* 2004; 104(8): 2499-2504.
47. Chiorazzi N FM. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 841-894.
48. Tobin G TU, Johnson A, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted V $\alpha$ 2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood* 2003; 101(12): 4952-4957.
49. Ghiotto F FF, Valetto A, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2004; 113(7): 1008-1016.
50. Tobin G TU, Karlsson K, et al. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004; 104(9): 2879-2885.
51. Mauerer K ZD, Gorgun G, et al. Immunoglobulin gene segment usage, location and immunogenicity in mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haem* 2005; 129(4): 499-510.
52. Fais F GF, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; 102(8): 1515-1525.
53. Messmer BT AE, Messmer D, Chiorazzi N. The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. *Blood* 2004; 103: 3490-3495.
54. Hadzidimitriou A ea. Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 113: 403-411.
55. Widhopf GF ea. Nonstochastic pairing of immunoglobulin heavy and light chains expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells is predicated on the heavy chain CDR3. *Blood* 2008; 111: 3137-3144.

56. Ghia EM JS, Widhopf GF II, et al. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post germinal central leukemogenic selection. *Blood* 2008; 111(10): 5101-5108.
57. Belessi C SK. Stereotyped B cell receptors in chronic lymphocytic leukemia. New biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia, eds K Stamatopoulos, P Ghia, R Rosenquist Wolters Kluwer Health Italy Ltd, Milan 2010, 119-132.
58. Kostareli E GM, Agathangelidis A, Stamatopoulos K. Immunoglobulin gene repertoire in chronic lymphocytic leukemia: insight into antigen selection and microenvironment interactions. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012;4: e2012052.
59. K S. Stereotyped B cell receptors in chronic lymphocytic leukemia. Immunoglobulin gene analysis in chronic lymphocytic leukemia, eds: P Ghia, R Rosenquist, F Davi Wolters Kluwer Health Italy Ltd, Milan 2009, 95-111.
60. NK J. The natural-selection theory of antibody formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 41(11): 849-857.
61. Klein U GT, Fisher M, et al. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev* 1998; 162: 261-280.
62. Herve M XK, Ng YS, et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest* 2005; 115(6): 1636-1643
63. Martin T CR, Weber JC, Kipps TJ, Pasquali JL. Structure-function studies on a polyreactive (natural) autoantibody: polyreactivity is dependent on somatically generated sequences in the third complementarity-determining region of the antibody heavy chain. *J Immunol* 1994; 152(12): 5988-5996.
64. Lanemo MA HE, Sidorova E, et al. A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood* 2008; 111(7): 3838-3848.
65. Stroka D BA, Bach F, et al. Overexpression of A1, an NF-k-inducible, anti-apoptotic BCL gene inhibits endothelial cell activation. *Blood* 1999;93:3803-3810.
66. Furmann RR AZ, Mascarebhas JO, et al. Modulation of NF-kB activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 2000;164:2200-2206.
67. Yair Herishanu B-ZK, Andrew Lipsky, Adrian Wiestner. *Biology of Chronic Lymphocytic Leukemia in Different Microenvironments: Clinical and Therapeutic Implications*. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013 April ; 27(2): 173–206.
68. Del Poeta G ML, Venditti A, et al. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;98:2633–2639.

69. Dürig J NM, Schmücker U, Renzing-Köhler K, Hölter T, Hüttmann A, Dührsen U. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2002;16(1):30.
70. Jaksic O ea. CD38 on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells has higher expression in lymph nodes than in peripheral blood or bone marrow. *Blood* 2004; 103(5):1968–9.
71. Vaisitti T ea. CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2010; 24(5):958–69.
72. Deaglio S ea. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 2007.
73. Patten PE ea. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* 2008; 111(10):5173–81.
74. Del Poeta G DPM, Zucchetto A, Luciano F, Buccisano F, et al. CD 69 is independently prognostic in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive clinical and biological profiling study. *Haematologica* 2012;97(2):279-87.
75. Dohner H SS, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343(26): 1910–1916.
76. Shanafelt TD GS, Kay Ne. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004; 103(4): 1202-10.
77. Fleming JL HT, Toland AE. The role of parental and grandparental epigenetic alterations in familial cancer risk. *Cancer Res* 2008; 68(22): 9116-9121.
78. Plass C BJ, Raval A, Tanner SM, de la Chapelle. Molecular profiling of chronic lymphocytic leukaemia: genetics meets epigenetics to identify predisposing genes. *Br J Cancer* 2007; 139(5): 744-752.
79. Rush LJ RA, Funchain P, Johnson AJ, Smith L, et al. Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. *Cancer Res* 2004; 64(7): 2424-2433.
80. Corcoran M PA, Orchard J, Davis Z, Wirtx M, et al. ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2005; 90(8): 1078-1088.
81. Kulis M MA, Heath S, Queirós AC, Schuyler RP, et al. Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. *Nat Genet* 2015 Jul; 47(7): 746-56.
82. Swerdlow SH CE HN, et al. World Health Organization Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC; 2008.
83. Scarfò L FA, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2016; 104: 169-182.

84. Caligaris-Cappio F HT. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 1999; 17(1):399–408.
85. Hallek M CB, Catovsky D 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(12):5446–5456.
86. Shanafelt TD GP, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia* 2010; 24(3): 512-520.
87. RP H. Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Lymphoma, and Monoclonal B-cell Lymphocytosis. *Surg Pathol Clin* 2010;3(4):907-931.
88. Marti GE RA, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 2005; 130(3): 325-332.
89. Dohner H SS, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med* 1999;77:266-281.
90. Kitada S AJ, Akar S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood* 1998;91:3379-3389.
91. Mapara MY BR, Zugck C, et al. APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression. *Eur J Immunol* 1993;23:702-708.
92. Tsuruda K YY, Hirakata Y, et al. Qualitative and quantitative characterization of Fas (APO-1/CD95) on leukemic cells derived from patients with B-cell neoplasms. *Leuk Res* 1999;23:159-166.
93. Korz C PA, Benner A, Mertens D, Schaffner C, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood* 2002;99(12):4554-4561.
94. Siegel RL MK, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65(1):5.
95. Jemal A SR, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59(4):225–249.
96. Hernández JA LK, McKenna RW. Leukemias, myeloma, and other lymphoreticular neoplasms. *Cancer* 1995;75(1 Suppl):381.
97. Yamamoto JF GM. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control* 2008;19(4):379.
98. Kobayashi T KK, Ohno T, Shirakawa S. Chronic lymphocytic leukemia in Japan. *Rinsho Ketsueki* 1990;31(5):554.
99. Yang C ZX. Incidence survey of leukemia in China. *Chin Med Sci J* 1991;6(2):65.

100. Zheng W LM, Shu XO, Pan RP, Gao YT, Fraumeni JF Jr. Prior medical conditions and the risk of adult leukemia in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Causes Control* 1993;4(4):361.
101. Wu SJ HS, Lin CT, Lin YJ, Chang CJ, Tien HF. The incidence of chronic lymphocytic leukemia in Taiwan, 1986-2005: a distinct increasing trend with birth-cohort effect. *Blood* 2010;116(22):4430.
102. AF F. The epidemiology of lymphomas and leukaemias in Africa-an overview. *Leuk Res* 1985;9(6):735.
103. Oloo AJ OT. Chronic lymphocytic leukaemia (CLL): clinical study at Kenyatta National Hospital (KNH). *East Afr Med J* 1984;61(11):797.
104. Rozman C ME, Rodriguez-Fernandez JM, et al. Chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med* 1995;333:1052–1057.
105. Howlader N NA, Kapcho M, Miller D, Bishop K, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seercancer.gov/csr/1975\\_2013/](http://seercancer.gov/csr/1975_2013/), based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.
106. Sant M AC, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010;116(19):3724.
107. Smith A HD, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by subtype: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 2011 Nov;105(11):1684-92 Epub 2011 Nov 01.
108. Swerdlow SH CE, Harris NL, et al. World Health Organization Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th edition. Lyon, France: IARC; 2008:180-182.
109. Goldin LR PR, Li X, Hemminki K. Familial risk of lymphoproliferative tumours in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family Cancer Database. *Blood* 2004;104:1850-1854.
110. Ishibe N SM, Fontaine L, et al. Clinical characteristics of familial B-CLL in the National Cancer Institute Familial Registry. *Leuk Lymphoma* 2001; 42(1-2): 99–108.
111. Slager SL BY, Blair A, Vermeulen R, Cerhan JR, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2014; 48: 41-51.
112. Slager SL CN, de Sanjose S, Goldin LR, et al. Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 2013; 50(4): 296-302.
113. Goldin LR BM, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2014; 94(5): 647-653.

114. Linet M.S. et al. Familial cancer history and chronic lymphocytic leukemia: a case control study. *Am J Epidemiol* 1989; 130 (4): 655-664.
115. Sellick GS, et al. Familial chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*; 2006; 33: 195-201.
116. Binet JL AA, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198–206.
117. Rai JL SA, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219–234.
118. Cheson BD BJ, Kai KR, et al. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the National Cancer Institute- sponsored working group. *Am J Hematol* 1988; 29(3): 152-163.
119. F C-C. Relationship between autoimmunity and immunodeficiency in CLL. *Hematol Cell Ther* 1997; 39(1): S13-S16.
120. Ghia P SC, Frenquelli M, Muzio M, Caligaris-Cappio F. From normal to clonal B cells: chronic lymphocytic leukemia (CLL) at the crossroad between neoplasia and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2007; 7: 127-131.
121. Hassan S PM, Yu E, Wrzolek M, Odaimi M. A 61-year-old man presents with myopathy, neuropathy, and inflammatory dermatitis responsive to chronic lymphocytic leukemia treatment. *Int J Gen Med* 2012; 5: 647-653.
122. TJ K. Chronic lymphocytic leukemia and related disease. In: *Williams Hematology*, eds: K. Kausansky, M. Lichtman, E. Beutler, Y. Kipps, J. Prchal, U. Seligsohn. McGraw-Hill, New York 2010, 1431-1481.
123. Qian SX LJ, Hong M, Xu W, Qiu HX. Nonhematological autoimmunity (glomerulosclerosis, paraneoplastic pemphigus and paraneoplastic neurological syndrome) in a patient with chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, prognosis and management. *Leuk Res* 2009; 33: 500-505.
124. JH W. Autoimmunity in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 2001; 2: 253-257.
125. Zent CS KN. Autoimmune complications in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Best Practice and Res Clin Haematol* 2010;23:47-59.
126. Strati P C-CF. A matter of debate in chronic lymphocytic leukemia: is the occurrence of autoimmune disorders an indicator of chronic lymphocytic leukemia therapy? *Curr Opin Oncol* 2011; 23(5): 455-460.
127. Barcellini W CS, Agostinelli RM, Mauro FR, Ambrosetti A, et al. Relationship between autoimmune phenomena and disease stage and therapy in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006; 91(12): 1689-1692.

128. Zent CS DW, Schwager SM, et al. The prognostic significance of cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:615–621.
129. Mauro FR FR, Cerretti, et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood* 2000; 95(9): 2786-2792.
130. Kipps TJ CD. Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases. *Blood* 1993; 81(10): 2475-2487.
131. Beaume A BA, Dreyfus B, Preud'homme JL. High incidence of serum monoclonal Igs detected by a sensitive immunoblotting technique in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1994; 84(4): 1216-1219.
132. Kyasa MJ PR, Schichman SA, Zent CS. Autoimmune cytopenia does not predict poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia/smaller lymphocytic lymphoma. *Am J Hematol* 2003; 74(1): 1-8.
133. Broker BM KA, Youinou P, et al. Chronic lymphocytic leukemic cells secrete multispecific autoantibodies. *J Clin Invest* 1988; 1(5): 469-481
134. Stevenson FK HT, Stevenson GT, Tutt AL. Extracellular idiotypic immunoglobulin arising from human leukemic B lymphocytes. *J Exp Med* 1980; 152(6): 1484-1496.
135. TJ H. Autoimmune complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33: 230-239.
136. Hodgson K FG, Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity: a systematic review. *Haematologica* 2011; 96: 752-761.
137. Hodgson K FG, Perira A, et al. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia: diagnosis and treatment. *Br J Haematol* 2011; 154: 14-22.
138. Moreno C HK, Ferrer G, et al. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: prevalence, clinical associations, and prognostic significance. *Blood* 2010;116(23):4771–4776.
139. Mittal S BM, Culligan DJ, et al. A high rate of CLL phenotype lymphocytes in autoimmune hemolytic anemia and immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2008; 03: 151-152.
140. Dearden C WR, Else M, et al. The prognostic significance of a positive direct antiglobulin test in chronic lymphocytic leukemia: a beneficial effect of the combination of fludarabine and cyclophosphamide on the incidence of hemolytic anemia. *Blood* 2008; 111(4): 1820-1826.
141. Ding W ZC. Diagnosis and management of autoimmune complications of chronic lymphocytic leukemia/smaller lymphocytic lymphoma. *Clin Adv Hematol Oncol* 2007; 5: 257-261.
142. Molica S LD, Levato L. Infections in chronic lymphocytic leukemia. analysis of incidence as a function of length of follow-up. *Haematologica* 1993; 78(6): 374-377.

143. Tsiodras S SG, Keating MJ, et al. Infection and immunity in chronic lymphocytic leukemia. *Mayo Clin Proc* 2000; 75(10): 1039-1054.
144. Perkins JG FJ, Howard RS, Byrd JC. Frequency and type of serious infections in fludarabine-refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: implications for clinical trials in this patient population. *Cancer* 2002; 94(7): 2033.
145. Ahmed S SA, Rossoff L, Sison CP, Rai KR. Pulmonary complications in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2003; 98(9): 1912.
146. S M. Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival, and treatment. *Leuk Lymphoma* 1994; 13(3-4): 203.
147. Francis S KM, Pratt G, Starczynski J, Hooper L, et al. The effect of immunoglobulin VH gene mutation status and other prognostic factors on the incidence of major infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2006; 107(5): 1023.
148. Anaissie EJ KD, O'Brien S, Kantarjian H, Robertson L, et al. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Ann Intern Med* 1998; 129(7): 559.
149. Hensel M KM, Yammeni S, Egerer G, Ho AD. Disease activity and pretreatment, rather than hypogammaglobulinaemia, are major risk factors for infections complications in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 122(4): 600.
150. VA M. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Practice and Res Clin Haematol* 2010; 23(1): 145-153.
151. Itala M HH, Nikoskelainem J, et al. Infections and serum IgG levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Cancer* 1992; 48(5): 266-270.
152. VA M. The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1998; 25(1): 98-106.
153. Rozman C ME, Vinolas N. Serum immunoglobulins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Natural history and prognostic significance. *Cancer* 1988; 61(2): 279-283.
154. Parikh SA LJ, Chaffee KG, Call TG, Hanson CA, et al. Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia: Natural history, clinical correlates, and outcomes. *Cancer* 2015; 121(17): 2883-91.
155. Garnica M NM. Epidemiology, treatment and prophylaxis of infections in chronic lymphocytic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2005; 27(4): 290-300.
156. TI R. Complications and causes of death in B cell chronic lymphocytic leukemia: a long term study of 105 patients. *Aust N Z J Med* 1990; 20(1): 44-50.
157. Ravandi F OBS. Immune defects in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immuno Immunother* 2006; 55: 197-209.

158. Lacombe C GJ, Dreyfus B, et al. Heterogeneity of serum IgG subclass deficiencies in B chronic lymphocytic leukemia. *Clin Immunol* 1999; 90: 128-132.
159. Griffiths H LJ, Bunch C, et al. Predictors of infection in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Clin Exp Immunol* 1992; 89(3): 374-377.
160. VA M. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. In: Cheson BD, editor. *Chronic lymphoid Leukemias*. Second Edition, revised and expanded. New York: Marcel Dekker, 2001: 505-523.
161. Aittoniemi J MA, Laine S, Sinisalo M, Laippala P, et al. Opsonising immunoglobulins and mannan-binding lectin in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1999; 34(3-4): 381-385.
162. Wadhwa PD MV. Infectious complications of chronic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33(2): 240-249.
163. Morrison VA HJ, Janoff EN. Systemic and mucosal immunoglobulin levels and risk of infection in patients with chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *Blood* 1996; 88: 240a.
164. Morra E NA, Montillo M. Infectious complications in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* 1999; 41: 145-151.
165. Heath ME CB. Defective complement activity in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 1985; 19(1): 63-73.
166. Schlesinger M BI, Lugassy G. The complement system is defective in chronic lymphocytic leukemia patients and in their healthy relatives. *Leukemia* 1996; 10(9): 1509-1513.
167. Bene MC NT, Bettelheim H, Buldini B, Bumbea H, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011; 25: 567-574.
168. Swerdlow SH CE, Pileri SA, Harris NL, Stein H, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127: 2375-2390.
169. Rawstron AC BF, O'Connor SJ, Kwok M, Fenton JA, Plummer M, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2008; 359(6): 575-583.
170. Ghia P C-CF. Monoclonal B-cell lymphocytosis: right track or red herring? *Blood* 2012;119(19):4358.
171. Landgren O AM, Ma W, et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2009; 360(7): 659-667.
172. Gibson SE SS, Ferry JA, Surti U, Dal Cin P, et al. Reassessment of small lymphocytic lymphoma in the era of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica* 2011; 96: 1144-1152.
173. Rawstron AC HP. Clinical and diagnostic implication of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Best Practice Research Clinical Haematology* 2010; 23: 61-69.

174. Oscier D DC, Erem E, Fegan C, Follows G, et al. Guidelines on the diagnosis, investigation and management of chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 2012; 159: 541-564.
175. Rossi D SE, Puma A, De Paoli L, Rasi S, Spina V, Gozzetti A, et al. The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br J Haematol* 2009;146(1):64.
176. Shanafelt TD KN, Rabe KG, Call TG, Zent CS, Maddocks K, et al. Brief report: natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009;27(24):3959-53.
177. Mulligan CS TM, Mulligan SP. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2008; 359(19): 2065-2066.
178. Dohner H SS, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343(26):1910–1916.
179. Vardi A DA, ScarfòL, Jelinek D, Newton D, Bennett F, et al. Immunogenetics shows that not all MBL are equal: the larger the clone, the more similar to CLL. *Blood* 2013 May;121(22):4521-8 Epub 2013 Apr 17.
180. Nieto WG AJ, Romero A, Teodosio C, López A, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 2009;114(1):33-37.
181. Shim YK RJ, Ghia P, Boren J, Abbasi F, Dagklis A, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis in healthy blood donors: an unexpectedly common finding. *Blood* 2014;123(9):1319-1326.
182. Ferrand C G-OF, Collonge-Rame MA, et al. Systematic donor blood qualification by flow cytometry would have been able to avoid CLL-type MBL transmission after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 2012;88:269–272.
183. Stetler-Stevenson M. Monoclonal B-cell lymphocytosis in donors. *Blood* 2014;123:1281-1282.
184. Kalpadakis C PG, Sachanas S, et al. New Insights into Monoclonal B-Cell Lymphocytosis. *BioMed Research International* 2014;2014:258917 doi:10.1155/2014/258917.
185. Bennett JM CD, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. *J Clin Pathol* 1989;42:567–584.
186. Matutes E WA, Catovsky D. Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Practice and Res Clin Haematol* 2007;20:367–384.
187. Binet JL BS MF, et al. Basket cells or shadow cells of Gumprecht: a scanning electron microscope study, and the correlation between percentages of basket cells, and cells with altered chromatin structure (dense cells), in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells* 1993;19:573–581.

188. Nowakowski GS HJ ST, et al. Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009;27:1844–1849.
189. Woessner S LRR, Sans-Sabrafen J. Diversidad morfológica de la leucemia linfática crónica. *Sangre* 1977;22:871-881.
190. Nowakowski GS HJ, Shanafelt TD, Geyer SM, LaPlant BR, et al. Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a universally available prognostic test. *Mayo Clin Proc* 2007;82(4):449.
191. Ciccone M AC, Rigolin GM, et al. Proliferation centers in chronic lymphocytic leukemia: correlation with cytogenetics and clinicobiological features in consecutive patients analyzed on tissue microarrays. *Leukemia* 2012;26:499–508.
192. Ben-Ezra J BJ, Schwartz WG, et al. Small lymphocytic lymphoma: a clinicopathologic analysis of 268 cases. *Blood* 1989;73:579–587.
193. Bennett JM CD DM, et al. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. *J Clin Pathol* 1989;42:567–584.
194. Vallespi T ME, Sanz MA. Chronic lymphocytic leukaemia: prognostic value of lymphocyte morphological subtypes: a multivariate survival analysis in 146 patients. *Br J Haematol* 1991; 77: 478-485.
195. Galton DA GJ, Wiltshaw E, Catovsky D, Henry K, Goldenberg GJ. Polymorphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1974;27:7-23.
196. Melo JV CD GD. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and polymorphocytic leukaemia. I. Clinical and laboratory features of 300 patients and characteristics of an intermediate group. *Br J Haematol* 1986;63:377–387.
197. Catovsky D FR. *The Lymphoid Leukaemias*. Butterworths, London 1990.
198. RM S. Polymorphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990;4(2):457.
199. Amato D OD, Davis Z, Mould S, Zheng J, et al. Cytogenetic aberrations and immunoglobulin VH gene mutations in clinically benign CD5- monoclonal B-cell lymphocytosis. *Am J Clin Pathol* 2007;128:33-338.
200. Zenz T M, Küppers R, et al. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Rev Cancer* 2010;10:37–50.
201. Eichorst B DM, Robak T, et al. Chronic lymphocytic leukemia: EMSO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2011;22(Suppl 6):50–54.
202. Rossi D FM, Rasi S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wildtype chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 119(12): 2854-2862.

203. Rossi D BA, Spina V, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 2011; 118(26): 6904-6908.
204. Villamor N CL, Martínez-Trillos A, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2013;27(5):1100–1106.
205. Rossi D RS, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119(2):521–529.
206. Gruber M WC. Evolving understanding of the CLL genome.; *Semin. Hematol.* 2014; 51(3): 177-187.
207. Villamor N L-GA, Lopez-Otin C, Campo E. Next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 2013; 50(4): 286-295.
208. Damm F ME, Cosson A, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov* 2014; 4(9): 1088-1101.
209. Ramsay AJ QV, Foronda M, et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2013; 45(5): 526-530.
210. Baliakas P HA, Sutton LA, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2014; 29(2): 329-336.
211. SN M. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 2013;32(23):2805–2817.
212. KS R. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol* 2006;132(6):705.
213. Grubor V KA, Troge JE, Meth JL, Lakshmi B, Kendall JT, et al. Novel genomic alterations and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia revealed by representational oligonucleotide microarray analysis (ROMA). *Blood* 2009;113(6):1294-303.
214. Buhmann R KC, Rehkla J, et al. CD40L stimulation enhances the ability of conventional metaphase cytogenetics to detect chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2002; 118: 968-975.
215. Mayr C, Speicher, MR, Kofler, DM, et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;107:742–751.
216. Dicker F SS, Haferlach T, et al. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, *IgVh* status, and CD38 expression. *Blood* 2006; 31(52): 3160.

217. Seiler T DH, Stilgenbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006;33:186-194.
218. Pinkel D AD. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet* 2005; 37: 11-17.
219. Gunn SR MM, Gorre ME, et al. Whole-genome scanning by array comparative genomic hybridization as a clinical tool for risk assessment in chronic lymphocytic leukemia. *J Mol Diagn* 2008; 10: 441-451.
220. Hagenkord JM MF, Kash SF, Lilleberg S, Xie Q, et al. Array-based karyotyping for prognostic assessment in chronic lymphocytic leukemia. Performance comparison of affymetrix 10K2.0, 250K Nsp and SNP6.0 arrays. *J Mol Diagn* 2010; 12: 184-196.
221. O'Malley DP GC, Chang AS, et al. Comparison of array comparative genomic hybridization (aCGH) to FISH and cytogenetics in prognostic evaluation of chronic lymphocytic leukemia. *Intl J Lab Hematol* 2011; 33: 238-244.
222. Zhang L ZI, Costa LJ, et al. Clonal diversity analysis using SNP microarray. A new prognostic tool for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet* 2011; 204: 654-665.
223. Shanafelt TD HC, Dewald GW, Witzig TE, LaPlant B, Abrahamson J, et al. Karyotype evolution on fluorescent in situ hybridization analysis is associated with short survival in patients with chronic lymphocytic leukemia and is related to CD49d expression. *J Clin Oncol* 2008;26:e5-6.
224. Juliusson G OD, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990;323:720-4.
225. Krober A BJ, Hafner S, Buhler A, Seiler T, et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006;24:969-975.
226. Krober A ST, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100(4): 1410-1416.
227. Matutes E OD G-MJ, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996;92:382-388.
228. Peterson LC LL, Church S, Kay NE. Frequent clonal abnormalities of chromosome band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: multiple clones, subclones, and nonclonal alterations in 82 midwestern patients. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;4:273-80.
229. Kapanadze B MN, Corcoran M, Jareborg N, Hammarsund M, Baranova A, et al. Comparative sequence analysis of a region on human chromosome 13q14, frequently deleted in B-cell chronic

lymphocytic leukemia, and its homologous region on mouse chromosome 14. *Genomics* 2000;70:327–34.

230. Kitamura E SG, Sossey-Alaoui K, Malaj E, Lewis J, Pan HQ, et al. A transcription map of the minimally deleted region from 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia as defined by large scale sequencing of the 650 kb critical region. *Oncogene* 2000;19:5772–80.

231. Mabuchi H FH, Calin G, Alder H, Negrini M, Rassenti L, et al. Cloning and characterization of CLLD6, CLLD7, and CLLD8, novel candidate genes for leukemogenesis at chromosome 13q14, a region commonly deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*2001;61:2870–7.

232. Migliazza A BF, Komatsu H, Cayanis E, Martinotti S, Toniato E, et al. Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;97:2098–104.

233. Rondeau G MI, Bezieau S, Petit JL, Heilig R, Fernandez S, et al. Comprehensive analysis of a large genomic sequence at the putative B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) tumour suppresser gene locus. *Mutat Res*2001;458:55–70.

234. Wolf S MD, Schaffner C, Korz C, Dohner H, Stilgenbauer S, et al. B-cell neoplasia associated gene with multiple splicing (BCMS): the candidate B-CLL gene on 13q14 comprises more than 560 kb covering all critical regions. *Hum Mol Genet* 2001;10:1275–85.

235. Rowntree C DV, Panayiotidis P, Kotsi P, Palmisano GL, Hoffbrand AV, et al. Deletion analysis of chromosome 13q14.3 and characterisation of an alternative splice form of LEU1 in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002;16:1267–75.

236. Liu Y HM, Grander D, Merup M, Wu X, Heyman M, et al. 13q deletions in lymphoid malignancies. *Blood* 1995;86:1911–5.

237. Bullrich F VM, Kitada S, Jurlander J, Caligiuri MA, Reed JC, et al. Minimal region of loss at 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*1996;88:3109–15.

238. Oscier DG GA, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage , IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100(4):1177-84.

239. Kalachikov S MA, Cayanis E, Frachiolla NS, Bonaldo MF, et al. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region delected in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* 1997; 42: 369-377.

240. Jeromin S WS, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia* 2014;28(1):108-17.

241. Rossi D RS, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121(8):1403-1412.

242. V A. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
243. Pekarsky Y CC. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death Differ* 2015; 22(1): 6-11.
244. Allegra D BV, Garding A, Dohner H, Stilgenbauer S, et al. Defective DROSHA processing contributes to downregulation of MiR-15/-16 in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2014; 28(1): 98-107.
245. Sampath D LC, Vasani K, et al. Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 119(5): 1162-1172.
246. Klein U LM, Crespo M, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010; 17: 28-40.
247. Dal-Bo M RF, Rossi D, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2011;50:633–643.
248. Ouillette P CR, Shakhani S, et al. The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2011;17:6778–6790.
249. Huang SJ GT, Gerrie AS, Hrynchak M, Karsan A, et al. Influence of clone and deletion size on outcome in chronic lymphocytic leukemia patients with an isolated deletion 13q in a population-based analysis in British Columbia, Canada. *Genes Chromosomes Cancer* 2016; 55(1): 16-24.
250. Gunnarsson R ML, Isaksson A, et al. Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2011; 96(8): 1161-1169.
251. G M. Chromosome Abnormalities with Prognostic Impact in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Pathol Oncol Res* 2005;11(4):205-10.
252. Jahrsdorfer B WJ, Blackwell SE, Taylor CM, Link BK, Weiner GJ. Good prognosis cytogenetics in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated in vitro with low susceptibility to apoptosis and enhanced immunogenicity. *Leukemia* (2005) 19, 759–766.
253. KS R. Chronic lymphocytic leukemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *The British Journal of Haematology* 2006; 132(6): 705-722.
254. Van Dyke DL ST, et al. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *The British Journal of Haematology* 2010; 148(4): 544-550.
255. Dewald GW BS, Paternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *The British Journal of Haematology* 2003; 121(2): 287-295.
256. Chena C AJ, Bezares RF, et al. Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and Clinical Studies. *The European Journal of Haematology* 2008; 81(2): 94-99.

257. Orlandi EM BP, Pascutto C, et al. Chronic lymphocytic leukemia with del13q14 as sole abnormality: dynamic prognostic estimate by interphase-FISH. *Hematological Oncology* 2013; 31(3): 136-142.
258. Garg R WW, Ferrajoli A, et al. The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2012; 118(14): 3531-3537.
259. Puiggros A DJ, Rodriguez-Vicente A, et al. Biallelic losses of 13q do not confer a poor outcome in chronic lymphocytic leukemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *The British Journal of Haematology* 2013; 163(1): 47-54.
260. Mosca L FS, Lionetti M, et al. Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clinical Cancer Research* 2010; 16(23): 5641-5653.
261. Rodriguez AE HA, Benito R, et al. Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia patients with high number of losses in 113q14. *PloS ONE* 2012; 7(11).
262. Amson R PS, Marine JC, Di Fiore PP, Telerman A. TPT1/TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. *Trends in Cell Biology*; 2013; 23(1): 37-46.
263. Nagano-Ito M IS. Biological effects of mammalian translationally controlled tumor protein (TCTP) on cell death, proliferation, and tumorigenesis. *Biochemistry Research International* 2012; 2012: 204960.
264. Rho SB LJ, Park MS, Byun HJ, Kang S, et al. Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 2011; 585(1): 29-35.
265. Puiggros A BG, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *BioMed Research International* 2014; 4358983.
266. Grygalewicz B WR, Rygier J, Borkowska K, Rzepecka I, Lukasik M, et al. Monoallelic and biallelic deletions of 13q14 in a group of CLL/SLL patients investigated by CGH Haematological Cancer and SNP array (8x60K). *Mol Cytogenet* 2016; 6(9): 1.
267. SN M. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 2013; 32(23): 2805-2817.
268. Mertens D WS, Tschuch C, et al. Allelic silencing at the tumor-suppressor locus 13q14.3 suggests an epigenetic tumor-suppressor mechanism. *Proceedings of the United States of America* 2006; 103(20): 7741-7746.
269. Marasca R MR, Martinelli S, et al. Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematological Oncology* 2013; 31(2): 348-355.

270. Herold T JV, Mulaw M, et al. Expression analysis of genes located in the minimally deleted regions of 13q14 and 11q22-23 in chronic lymphocytic leukemia-unexpected expression pattern of the RHO GTPase activator ARHGAP20. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:546–558.
271. Aalto Y E-RW, Vilpo L, et al. Distinct gene expression profiling in chronic lymphocytic leukemia with 11q23 deletion. *Leukemia* 2001;15:1721–1728.
272. Gunn SR HM, Ismail SH, et al. Atypical 11q deletions identified by array CGH may be missed by FISH panels for prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009; 23(5): 1011-1017.
273. Gardiner AC CM, Oscier DG. Cytogenetic, fluorescence in situ hybridization, and clinical evaluation of translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20(1):73-81.
274. Dickinson JD SL, Sanger WG, et al. Unique gene expression and clinical characteristics associated with the 11q23 deletion in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005; 128: 460-471.
275. Sperka T WJ, Rudolph KL. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(9): 579-590.
276. Schaffner C SS, Rappold GA, Dohner H, Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94(2): 748-753.
277. Stankovik T WP, Stewart G, Bedenham T, Murray J, et al. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 1999; 353(9146): 26-29.
278. Austen B PJ, Alvi A, et al. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 2005;106:3175–3182.
279. Ouillette P LJ, Shaknovich R, et al. Incident and clinical implications of ATM aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2012; 51(12): 1125-1132.
280. Skowronska A PA, Ahmed G, et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol* 2012; 30(36): 4524-4532.
281. Tosi S RA. *The genetic basis of haematological cancers*. edition. s, editor2016.
282. Rossi D DS, Dominguez-Sola D, Rasi S, Vaisitti T, et al. Alterations of BIRC3 and multiple other NF- $\kappa$ B pathways genes in splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 2011; 118(18): 4930-4.
283. Vogelstein B L, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307–310.

284. Hallek M FK, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376(9747): 1164–1174.
285. Zenz T HS, Denzel T, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009;114(13): 2589–2597.
286. Monni O KS. 11q deletions in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 2001;40:259–266.
287. Skowronska A AB, Powell JE, et al. ATM germline heterozygosity does not play a role in chronic lymphocytic leukemia initiation but influences rapid disease progression through loss of the remaining ATM allele. *Haematologica* 2012;97:142–146.
288. Austen B SA, Baker C, et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol* 2007;25:5448–5457.
289. Roos-Weil D N-K, Chevret S et al. Mutational and cytogenetic analyses of 177 CLL patients with trisomy 12: a retrospective study of the CLL french intergroup. *Blood* 2013; 122(21):4144.
290. Oscier DG SJ, Hamblin TJ, Pickering RM, Lambert R, Fitchett M. Correlation of chromosome abnormalities with laboratory features and clinical course in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *The British Journal of Haematology* 1990; 76(3): 352-358.
291. Matutes E OD, Garcia-Marco J, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996;92:382–388.
292. Quijano S LA, Rasiloo A, et al. Impact of trisomy 12, del(13q), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry* 2008; 74(3): 139-149.
293. Gattei V BP, del Principe MI, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111(2): 865-873.
294. Balatti V BA, Palamarchuck A, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 2012; 119(2): 329-331.
295. Landau DA CS, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013;152(4):714-26.
296. Falisi E NE, Visco C, et al. B-cell receptor configuration and mutational analysis of patients with chronic lymphocytic leukemia and trisomy 12 reveal recurrent molecular abnormalities. *Hematological Oncology* 2014; 32(1): 22-30.

297. Sellmann L GS, Walter C, et al. Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in C-chronic lymphocytic leukemia. *The British Journal of Haematology* 2007; 138(2): 217-220.
298. Kienle DL KC, Hosch B, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis associated genes. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(16): 3780-3792.
299. Geisler C PP, Hansen M. B-cell chronic lymphocytic leukemia: clonal chromosome abnormalities and prognosis in 89 cases. *Eur J Haematol* 1989;43:397–403.
300. Criel A ML, de Wolf-Peters C. The concept of typical and atypical chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1999;33:33–45.
301. Athanasiadou A SK, Tsompanakou A, et al. Clinical, immunophenotypic, and molecular profiling of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia and comparison with other karyotypic subgroups defined by cytogenetic analysis. *Cancer, Genetics and Cytogenetics* 2006; 168(2): 109-119.
302. Cortese D SL, Cahill N, Smedby KE, Geisler C, Gunnarsson R, et al. On the way towards a 'CLL prognostic index': focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia* 2014;28(3):710-3.
303. Schnaiter A PP, Rossi M, Zenz T, Buhler A, Winkler D, et al. NOTCH1, SF3B1, and TP53 mutations in fludarabinerefractory CLL patients treated with alemtuzumab: results from the CLL2H trial of the GCLLSG. *Blood* 2013;122(7):1266-70.
304. Zenz T KA, Scherer K, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008; 112(8): 3322–3329.
305. Malcikova J SJ, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 2009;114(26):5307-14.
306. Dicker F HH, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2009; 23(1):117-24.
307. Gonzalez D MP, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol* 2011; 29(16) :2223-2229.
308. Pospisilova S GD, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26(7):1458-61.
309. Zainuddin N MF, Kanduri M, Gunnarsson R, Smedby KE, Enblad G, et al. TP53 Mutations are infrequent in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2011;35(2):272-4.

310. Johnston JB DP, Verburg L, et al. p53, mdm-2, bax and bcl-2 and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1997;26:435–449.
311. Christodoulopoulos G FN, Krajewski S, et al. Relationship between nitrogen mustard drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and protein expression of Bcl-2, Bax, Bcl-X and p53. *Cancer Lett* 1997;121:59–67.
312. Cordone I MS, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, et al. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Bood* 1998;91:4342-4349.
313. Grever MR LD, Dewald GW, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol* 2007;25:799-804.
314. Zenz T EB, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28(29): 4473-4479.
315. He G SZ, Huang Z, Wang R, Koomen J, et al. Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene* 2005; 24(18): 2929-2943.
316. Cox ML MD. Phosphorylation of serine 392 in p53 is a common and integral event during p53 induction by diverse stimuli. *Cell Signal* 2010; 22(3): 564-571.
317. Slee EA OCD, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 2004; 23(16): 2809-2818.
318. T S. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 910: 121-137.
319. L W. Genetic stabilization by p53 involves growth regulatory and repair pathways. *J Biomed Biotechnol* 2001; 1(1): 7-10.
320. Brown CJ LS, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(12): 862-873.
321. Rossi D CM, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, et al. The prognostic value of TP mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 2009; 15(3): 995-1004.
322. Rossi D SV, Deambrogi C, et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood* 2011;117:3391–3401.
323. Konikova E KJ. Altered expression of p53 and MDM2 proteins in hematological malignancies. *Neoplasma* 2003; 50(1): 31-40.
324. Asslaber D PJ, Seyfried I, et al. microRNA-34a expression correlates with MDM2 SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; 115(21): 4191-4197.

325. Tam CS ST, Wierda WG, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M.D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 2009; 114(5): 957–964.
326. Best OG GA, Davis ZA et al. A subset of Binet stage A CLL patients with TP53 abnormalities and mutated IGHV genes have stable disease. *Leukemia* 2009;23:212–214.
327. Delgado J EB, Oliveira AC. Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *The British Journal of Haematology* 2012; 157(1): 67-74.
328. Wawrzyniak E KA, Blosnky JZ, et al. Clonal evolution in CLL patients as detected by FISH versus chromosome banding analysis, and its clinical significance. *The European Journal of Haematology* 2014; 92(2): 91-101.
329. Catovsky D RS, Matutes E. et al. Assessment of fluradabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised trial. *The Lancet* 2007; 370(9583): 230-239.
330. Shanafelt TD WT, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006;24(28):4634–4641.
331. Stilgenbauer S ZT, Winkler D, et al. Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27(24): 3994-4001.
332. Fabris S ML, Todoerti K, et al. Molecular and transcriptional characterization of 17p loss in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes and Cancer* 2008; 47(9): 781-793.
333. Rossi D KH, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Fama R, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014;123(14):2139-47.
334. Rassenti LZ JS, Keating MJ, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 112(5): 1923-1930.
335. Rudenko HC EM, Dearden C, et al. Characterising the TP53-deleted subgroup of chronic lymphocytic leukemia: an analysis of additional cytogenetic abnormalities detected by interphase fluorescence in situ hybridisation and array-based comparative genomic hybridisation. *Leukemia & Lymphoma* 2008; 49(10): 1879-1886.
336. Put N MP, Chatelain B, et al. Translocations t(14;18) is not associated with inferior outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009; 23(6): 1201-1204.

337. Put N VRK, Konings P, Meeus P, Brusselmans C, et al. Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course. *Ann Hematol* 2012 Jun;91(6):863-73.
338. Huh YO LK, Vega F, et al. MYC translocation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with increased prolymphocytes and a poor prognosis. *Br J Haematol* 2008;142:36–44.
339. Nowakowski G, Dewald, GW, Hoyer, JD, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization with an IGH probe is important in the evaluation of patients with a clinical diagnosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haem* 2005;130:36–42.
340. Kyle RA RS. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004;351:1860–1873.
341. Fonseca R BB, Bataille R, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 2004;64:1546–1558.
342. Hanada M DD, Aiello A, et al. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993;82:1820–1828.
343. Robertson LE PW, McConnell K, et al. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* 1996;10:456–459.
344. Au WY HD, Ohno H, et al. Bcl-3/IgH translocation (14;19)(q32;q13) in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2002;43:813–816.
345. Fabbri G RS, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011;208(7):1389–1401.
346. Puente XS PM, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475(7354):101–105.
347. Rosati E SR, Rampino G, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 2009; 113: 856-865.
348. Shedden K LY, Ouillette P, Malek SN. Characteristics of chronic lymphocytic leukemia with somatically acquired mutations in NOTCH1 exon 34. *Leukemia* 2012; 26(5): 1108-1110.
349. Rossi D RS, Spina V, et al. Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2012;158:426–429.
350. Quesada V CL, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; 44(1): 47-52.
351. Weng AP FA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004;306(5694):269–271.
352. Reya T ORM, Okamura R, Devaney E, Willert K, et al. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 2000; 13(1): 15-24.

353. Qiang YW EY, Rubin JS, Rudikoff S. Wnt signaling in B-cell neoplasia. *Oncogene* 2003; 22(10): 1536-1545.
354. Giles RH vEJ, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653(1): 1-24.
355. Peifer M PP. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 2000; 287(5458): 1606-9.
356. Lu D ZY, Tawatao R, Cottam HB, Sen M, Leoni LM, et al. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(9): 3118-3123.
357. Howe D BT. Variation of LEF-1 mRNA expression in low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Res* 2006; 30(1): 29-32.
358. Gandhirajan RK P-WS, Gehrke I, Kreuzer KA. Wnt/B-catenin/LEF-1 signaling in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a target for current and potential therapeutic options. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; 10(7): 716-727.
359. Wang L SA, Lawrence M, et al. Somatic mutations as a mechanism of Wnt/B-catenin pathway activation in CLL. *Blood* 2014; 124(7): 1089-1098.
360. A E. Old and new news in CLL: "It's the pathway, stupid!". *Blood*, 2014; 124(7): 989-990.
361. Moskalev EA LK, Vorobjev IA, et al. Concurrent epigenetic silencing of wnt/B-catenin pathway inhibitor genes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *BMC Cancer* 2012; 12: 213.
362. Messina M DGI, Khiabani H, Rossi D, et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia chemo-refractoriness. *Blood* 2014; 123(15): 2378-88.
363. Wang L LM, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365(26): 2497-2506.
364. Ferreira PG JP, Rico D, et al. Transcriptome characterization by RNA sequencing identifies a major molecular and clinical subdivision in chronic lymphocytic leukemia. *Genome Res* 2014; 24(2): 212-226.
365. Te Raa GD DI, Navrkalova V, et al. The impact of SF3B1 mutations in CLL on the DNA-damage response. *Leukemia* 2015; 29(5): 1133-1142.
366. TD S. Predicting clinical outcome in CLL: how and why. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2009:421-429.
367. Tsimberidou A-M KM, Wierda WG. Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malignancy Rep* 2007;2:265-271.
368. Byrd J, Gribben, JG, Peterson, BL, et al. Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol* 2006;24:437-443.

369. Chen C PS. Prognostic Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2016 Jan 9.
370. Binet JL C-CF, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G, et al. Perspectives on the use of new diagnostics tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;107:859-861.
371. Kay NE OBS, Pettit AR, Stilgenbauer S. The role of prognostic factors in assessing "high-risk" subgroups of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007;21:1885-1891.
372. Van Bockstaele F VB, Philippé J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev* 2009;23:25-47.
373. Mauro FR GD, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood* 1999;94:448-454.
374. Catovsky D FJ, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. *Br J Haematol* 1989;72:141-149.
375. Auer RL BN, Neilson J. The sequential analysis of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999;104:742-744.
376. Shanafelt TD BJ, Call TG et al. Narrative review: initial management of newly diagnosed, early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Ann Intern Med* 2006;145:435-447.
377. Lee JS DD, Kantarjian HM, et al. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood* 1987;69:929-936.
378. Shanafelt TD BD, Venkat C, et al. Quality of life in chronic lymphocytic leukemia: an international survey of 1482 patients. *Br J Haem* 2007; 139: 255-264.
379. group IC-lw. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2016; 17(6): 779-90.
380. Shanafelt TD RK, Kay NE, et al. Age at diagnosis and utility of prognostic testing in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2010;116:4777-4787.
381. De Lima M OBS LS, et al. Chronic lymphocytic leukemia in the young patient. *Semin Oncol* 1998;25:107-116.
382. S M. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1477-1480.
383. Shanafelt TD KN, Jenkins G, et al. B-cell count and survival: differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-cell lymphocytosis based on clinical outcome. *Blood* 2009; 113: 4188-4196.
384. Montserrat E S-BJ, Viñolas N, et al. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. Analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; 62: 567-575.

385. Pepper C MA, Lin TT, et al. Defining the prognosis of early stage chronic lymphocytic leukaemia patients. *Br J Haematol* 2011; 156: 499-507.
386. Wierda WG OBS, Wang X, et al. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109:4679–4685.
387. Hallek M WL, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, Schick HD, Kuhn-Hallek I, Emmerich B. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996 Aug;22(5-6):439-47.
388. Bergmann MA EB, Busch R et al. Prospective evaluation of prognostic parameters in early stage chronic lymphocytic leukemia (CLL): Results of the CLL1-protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG). *ASH Annual Meeting Abstracts* 2007; 110: 625.
389. Di Giovanni S VG, Carducci P, Giallonardo P. Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1989;81(4):181-5.
390. Simonsson B DA, Tötterman T, Wibell L. Production of  $\beta$ 2 microglobulin by chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *EUROPEAN JOURNAL OF HAEMATOLOGY* 2009;36(5):424-429.
391. Montillo M HT, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005 Mar;90(3):391-9.
392. Cmunt E MK, Sindelárová L, Karban J, Zemanová Z, Kurková S, Brezinová J, Schwarz J, Bosáková Z. Importance of prognostic factors in patients with chronic B-lymphocytic leukemia at the time of diagnosis. *Sb Lek* 2002;103(3):359-70.
393. Pavlidis AN K-EJ, Bourantas LC, Lambrou A, Mavridis A. Serum tumor markers in non-Hodgkin's lymphomas and chronic lymphocytic leukemia. *Int J Biol Markers* 1993 Jan-Mar;8(1):14-20.
394. Pratt G TP, Marden N, Alexander D, Davis Z, Hussey D, Parry H, Harding S, Catovsky D, Begley J, Oscier D. Evaluation of serum markers in the LRF CLL4 trial:  $\beta$ 2m but not serum free light chains, is an independent marker of overall survival. *Leuk Lymphoma* 2016 Jan 6:1-31.
395. Keating MJ LS, Kantarjian H, et al. The serum B2-microglobulin (B2m) level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 1995; 86 (Suppl1): 606a
396. Jain P RK. Overview of recent developments in chronic lymphocytic leukemia. *South Asian Journal of Cancer* 2012; 1(2): 84-89.
397. Stilgenbauer S SA, Paschka P, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL4 trial. *Blood* 2014; 123(21): 3247-3254.

398. Wierda WG, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, et al. Characteristics associated with important end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol* 2009; 27(10): 1637.
399. Gentile M, Rossi D, Vincelli I, Tripepi G, et al. Italian external and multicentric validation of the MD Anderson Cancer Center nomogram and prognostic index for chronic lymphocytic leukemia patients: analysis of 1502 cases. *Br J Haematol* 2014; 167(2): 224-232.
400. Yoon JY, Dawe D, Laksi S, Kumar R, et al. Association of interleukin-6 and interleukin-8 with poor prognosis in elderly chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2012; 53(9): 1735-1742.
401. Letestu R, Eclache V, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood* 2010; 116: 4588-4590.
402. Gentile M, Neri A, et al. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet stage A stages. *Haematologica* 2009; 94: 887-888.
403. Delgado J, Phillips N, et al. Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment free survival in patients with chronic lymphocytic leukemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *Br J Haematol* 2009; 145: 801-805.
404. Ferrajoli A, Manshouri T, et al. The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1215-1219.
405. Fayad L, Reuben JM, et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood* 2001; 97: 256-263.
406. Lai R, Maushouri T, et al. Prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2002; 95: 1071-1075.
407. Wierda WG, Do K-A, et al. Plasma interleukin 8 level predicts for survival in chronic lymphocytic leukemia. *British Journal of Haematology* 2003; 120: 452-456.
408. Francia di Cell P, Riera L, et al. Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood* 1996; 87: 4382-4389.
409. Shen QD, Yu H, Li L, Zhang SJ, Li JY. Prognostic significance of lactate dehydrogenase and beta2-microglobulin in chronic lymphocytic leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2007 Dec;15(6):1305-8.
410. Itoyama T, Yamada Y, Sukasaki K, Aogami S. Cytogenetic analysis and clinical significance in adult T-cell. *Leukemia/lymphoma*, 2001;97: 3612-3620.
411. Eichhorst B, Dreyling M. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2009;20 (Supplement 4): iv102-iv104.

412. Desablens B GR, Lamour C. Prognostic value of LDH and  $\beta$ 2 microglobulin in B-CLL. Analysis of 275 patients. VII International Workshop on CLL1997;81a.
413. Shvidel L TT, Braester A, Bairey O, Rahimi-Levene N, et al. Serum immunoglobulin levels at diagnosis have no prognostic significance in stage A chronic lymphocytic leukemia: a study of 1113 cases from the Israeli CLL Study Group. *Eur J Haematol* 2014; 93(1): 29-33.
414. Del Giudice I CS, Tavoraro S, et al. Spontaneous regression of chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic features of 9 cases. *Blood* 2009;114:638–646.
415. Abrisqueta P PA, Rozman C, et al. Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980–2008): the Hospital Clínic of Barcelona experience. *Blood* 2009;114:2044–2050.
416. Bulian P TM, Rossi D, et al. Multicentre validation of a prognostic index for overall survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematological Oncol* 2011;29:91–99.
417. Dighiero G BJ-L. When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1799–1801.
418. Shanafelt TD JG, Call TG, et al. Validation of a new prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2009;115:363–372.
419. Leukemia IWoCL. Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. *Ann Intern Med* 1989;110(3):236.
420. Rai KR KH. Chronic lymphocytic leukemia. In: Holland JF, Bast RC, Morton DL, et al, eds. *Cancer Medicine* 4th ed Baltimore, Md: Williams and Wilkins; 1997 Vol II: 2697-2728.
421. [Guideline]. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Non-Hodgkin's Lymphomas Version 1.2016. National Comprehensive Cancer Network Available at [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/nhl.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nhl.pdf).
422. Foa R DGI, Guarini A, Rossi D, Gaidano G. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2013; 98(5): 675-685.
423. Stilgenbauer S SS, Bullinger L, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* 2007;92(9):1242–1245.
424. Kujawski L OP, Erba H, Saddler C, Jakubowiak A, Kaminski M, et al. Genomic complexity identifies patients with aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 112(5): 1993-2003.
425. Gunnarsson R IA, Mansouri M, Goransson H, Jansson M, Cahill N, et al. Large but not small copy-number alterations correlate to high-risk genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia: a high-resolution genomic screening of newly diagnosed patients. *Leukemia* 2010; 24(1): 211-215.

426. Ouillette P FS, Parkin B, Ding L, Bockenstedt P, Al-Zoubi A, et al. Agressive chronic lymphocytic leukemia with elevated genomic complexity is associated with multiple gene defects in the response to DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* 2010; 16(3): 835-847.
427. Ouillette P CR, Shakhn S, Li J, Peres E, et al. Acquired genomic copy number abberations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118(11): 3051-3061.
428. Knight SJL YC, Clifford R, et al. Quantification of subclonal distributions of recurrent genomic aberrations in paired pre-treatment and relapse samples from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26(7):1564-1575.
429. Schuh A BJ, Humphray S, Alexa A, Burns A, Clifford R, et al. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood* 2012;120(20):4191-6.
430. Baliakas P HA, Sutton LA, et al. European Research Iniciative on CLL (ERIC). Recorrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2015; 29(2): 329-336.
431. Oscier DG R-ZMWN, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 2013; 121(3): 468-475.
432. Dreger P SA, Zenz T, et al. TP53 , SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome of allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood* 2013; 121(16): 3284-3288.
433. Robbe P GR, Clifford RM, et al. Mutational landscape of 118 relapse chronic lymphocytic leukemia clinical trial samples: evidence for a multiple-hit profile using targeted next generation sequencing. *Blood* 2014; 124(21).
434. Guieze R WC. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2015; 126(4): 445-453.
435. Berkova A ZZ, Trneny M, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia studied by interphase fluorescence in-situ hybridization. *Neoplasma* 2009; 56(5): 455-458.
436. Morabito F ML, Cutrona G, Agnelli L, Tuana G, Ferracin M, et al. Clinical monoclonal B lymphocytosis versus Rai 0 chronic lymphocytic leukemia: A comparison of cellular, cytogenetic, molecular, and clinical features. *Clin Cancer Res* 2013; 19(21):5890-900.
437. Lens D DM, Garcia-Marco JM, et al. p53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. *Br J Haematol* 1997;99:848–857.
438. Kay NE E-PJ, Braggio E, et al. Progressive but previously untreated CLL patients with greater array CGH complexity exhibit a less durable response to chemoimmunotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;203:161–168.

439. Ouillette P S-CK, Seymour E, Li C, Shedden K, Malek SN. Clonal evolution, genomic drivers, and effects of therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2013; 19(11): 2893-2904.
440. Braggio E KN, VanWier S, et al. Longitudinal genome-wide analysis of patients with chronic lymphocytic leukemia reveals complex evolution of clonal architecture at disease progression and at the time of relapse. *Leukemia* 2012;26(7):1698-1701.
441. Ojha J AJ, Secreto C, et al. Deep sequencing identifies genetic heterogeneity and recurrent convergent evolution in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2015; 125(3): 492-498.
442. Cuneo A BR, Rigolin GM, et al. Late appearance of the 11q22.3-23-1 deletion involving the ATM locus in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. Clinico-biological significance. *Haematologica* 2002; 87(1): 44-51.
443. Landau DA TE, Taylor-Weiner AN, et al. Subclonal driver mutations predict shorter progression free survival in chronic lymphocytic leukemia following first-line chemo(immuno) therapy: results from the CLL8 trial. *Blood* 2014; 124(21): 1938-1938.
444. Stephan Stilgenbauer SS, Lars Bullinger, Axel Benner, Elke Leupolt, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. . *Haematologica* 2007; 92:1242-1245.
445. Landau DA CS, Getz G, Wu CJ. Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia* 2014; 28(1): 34-43.
446. Janssens A vRN, Poppe B, et al. High-risk clonal evolution in chronic B-lymphocytic leukemia: single-center interphase fluorescence in situ hybridization study and review of the literature. *The European Journal of Haematology* 2012; 89(1): 72-80.
447. Tsimberidou AM KM. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer* 2005; 103(2): 216–228.
448. Lee A SM, 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(3): 348.
449. Brecher M BP. Hodgkin's disease variant of Richter's syndrome. Report of eight cases. *Am J Clin Pathol* 1990;93:333-339.
450. Bockorny B CI, Dasanu CA. Hodgkin lymphoma as Richter transformation in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective analysis of world literature. *Br J Haematol* 2012; 156(1): 50–66.
451. Tsimberidou AM OBS, Kantarjian HM, Koller C, Hagemeister FB, et al. Hodgkin transformation of chronic lymphocytic leukemia: the M. D. Anderson Cancer Center experience. . *Cancer* 2006; 107(6): 1294.

452. Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. International Agency for Research on Cancer: Lyon, France; 2008.
453. De Paoli L FM, Gaidano G, et al. Predictive markers and driving factors behind Richter syndrome development. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011;11:433–442.
454. Morrison VA RK, Peterson BL, et al. Transformation to Richter's Syndrome or Prolymphocytic Leukemia (PLL): an Intergroup Study (CALGB 9011). *Blood* 1999; 94: 539a.
455. Robertson LE PW, O'Brien S, Kantarjian H, Hirsch-Ginsberg C, Cork A, et al. Richter's syndrome: a report on 39 patients. *J Clin Oncol* 1993; 11(10): 1985.
456. Yee KW OBS, Giles FJ. Richter's syndrome: biology and therapy. *Cancer J* 2005; 11(3): 161.
457. Rossi D CM, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2008; 142(2): 202-215.
458. Parikh SA RK, Call TG, Zent CS, Habermann TM, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort study of newly diagnosed patients. *Br J Haematol* 2013; 162(6): 774-782.
459. Harousseau JL FG, 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(6): 1302.
460. Tsimberidou A-M OBS, Khouri S, 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;24:2343–2351.
461. Tsimberidou AM KM. Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33(2): 250-256.
462. Foon KA TR, Saven A, Bernstein ZP, Gale RP. Genetic relatedness of lymphoid malignancies. Transformation of chronic lymphocytic leukemia as a model. *Ann Intern Med* 1993; 119(1): 63.
463. BeàS L-GA, Ribas M, Puig X, Pinyol M, et al. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am J Clin Pathol* 2002; 161(3): 957.
464. Kjeldsberg CR MJ. Prolymphocytic transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1981;48(11):2447.
465. Cao F AD, Wang C. Concurrent chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia derived from two separate B-cell clones. *Am J Hematol* 2011;86:782.
466. JR B. The treatment of relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2011; 2011: 110-118.

467. Zenz T GJ, Hallek M, Dohner H, Keating MJ, Stilgenbauer S. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood* 2012;119(18): 4101-4107.
468. Keating MJ OBS, Kontoyiannis D, et al. Results of first salvage therapy for patients refractory to a fludarabine regimen in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 1755-1762.
469. Nastoupil LJ FC. Management of relapsed chronic lymphocytic leukemia: applying guidelines to practice. *Community Oncology*, 9(12), S85–S92.
470. Wang J KH, Rossi D, et al. Tumor evolutionary directed graphs and the history of chronic lymphocytic leukemia. *ELife* 2014; 3.
471. Trbusek M SJ, Malcikova J, et al. Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2703-2708.
472. Dohner H FK, Bentz M, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and nonresponse to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995; 85: 1580-1589.
473. Stilgenbauer S DH. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N Engl J Med* 2002; 347: 452-453.
474. Lozanski G HN, Flinn IW, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood* 2004; 103: 3278-3281.
475. O'Brien S JJ, Coutre S, et al. Efficacy and safety of ibrutinib in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic leukemia with 17p deletion: results from the phase II RESONATE™-17 trial [abstract]. *Blood* 2014; 124(21) Abstract 327.
476. Sharman JP CS, Furman RR, et al. Second interim analysis of a phase 3 study of idelalisib (ZYDELIG<sup>®</sup>) plus rituximab (R) for relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL): efficacy analysis in patient subpopulations with Del(17p) and other adverse prognostic factors [abstract]. *Blood* 2014; 124(21) Abstract 330.
477. Eichhorst BF BR, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107(3): 885-891.
478. Woyach JA FR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, Xue L, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med* 2014; 370(24): 2286-94.
479. Liu TM WJ, Zhong Y, Lozanski A, Lozanski G, Dong S, et al. Hypermorphic mutation of phospholipase C,  $\gamma 2$  acquired in ibrutinib-resistant CLL confers BTK independency upon B-cell receptor activation. *Blood* 2015; 126(1): 61-8.
480. Burger JA LD, Hoellenriegel J, et al. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) developing resistance to BTK inhibition. *Blood* 2013; 122(21): 866.

481. Wen R CY, Xue L, Schuman J, Yang S, Morris SW, Wang D. Phospholipase Cgamma2 provides survival signals via Bcl2 and A1 in different subpopulations of B cells. *J Biol Chem* 2003; 278(44): 43654-62.
482. Woyach JA BE, Ruppert AS, Stefanovski MR, Goettl VM, Smucker KA, Smith LL, et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 2014; 123(8): 1207-13.
483. Benjamini O JP, Trinh L, Qiao W, Strom SS, Lerner S, et al. Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia who received frontline fludarabine, cyclophosphamide and ritumixab therapy: distribution and clinical outcomes. *Leuk Lymphoma* 2014; 1-8.
484. Seftel MD DA, Banerji V, et al. High incidence of chronic lymphocytic leukemia (CLL) diagnosed by immunophenotyping: a population-based Canadian cohort. *Leuk Res* 2009;33:1463–1468.
485. A F. Treatment of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010: 82-89.
486. Brenner H GA, Pulte D. Trends in long-term survival of patients with chronic lymphocytic leukemia from the 1980s to the early 21st century. *Blood* 2008; 111(10): 4916-21.
487. Call TG PR, Noel P, Habermann TM, Beard CM, et al. Incidence of chronic lymphocytic leukemia in Olmsted County, Minnesota, 1935 through 1989, with emphasis on changes in initial stage at diagnosis. *Mayo Clin Proc* 1994; 69(4): 323-8.
488. Howlander N NA, Kapcho M, Miller D, Bishop K, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seercancer.gov/csr/1975\\_2013/](http://seercancer.gov/csr/1975_2013/), based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.
489. Marcos-Gragera R AC, Tereanu C, De AR, Capocaccia R, et al. Survival of European patients diagnosed with lymphoid neoplasms in 2000-2002: results of the HAEMACARE project. *Haematologica* 2011; 96(5): 720-728.
490. Bennett JM RB, Oken MM, Rubin P, Silber R. The prognosis and therapy of chronic lymphocytic leukemia under age 50 years. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30(5-6): 411-2.
491. Molica S BM, Callea V, Morabito F, Levato D, et al. Comparison of younger versus older B-cell chronic lymphocytic leukemia patients for clinical presentation and prognosis. A retrospective study of 53 cases. *Eur J Haematol* 1994; 52(4): 216-21.
492. Montserrat E GF, Vallespi T, Rios A, Romero A, et al. Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults. *Blood* 1991; 78(6) 1545-51.
493. Bairey O RR, Rahimi-Levene N, Herishanu Y, Braester A, et al. Presenting features and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients diagnosed at age 80 years or more. *Ann Hematol* 2011; 90(10): 1123-1129.

494. Parikh SA RK, Kay NE, et al. Chronic lymphocytic leukemia in young (<55 years) patients: a comprehensive analysis of prognostic factors and outcomes. *Haematologica* 2014; 99(1): 140-147.
495. Pamuk G PO, Soysal T, Ongoren S, Bas,lar Z, et al. An overview of young CLL patients: a single-centre experience from Turkey. *Haematologia (Budap)* 2002; 31(4): 303-11.
496. Juliusson G MM. Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1998; 25: 19-26.
497. Del Giudice I MF, De Propis MS, Santangelo S, Marinelli M, et al. White blood cell count at diagnosis and immunoglobulin variable region gene mutations are independent predictors of treatment-free survival in young patients with stage A chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2011; 96(4): 626-630.
498. Li WJ GL, Hou M, Sun JZ, Shao LL, et al. Chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization and their association with clinical features. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2010; 18(2): 494-498.
499. Aoun P BH, Smith LM, Dave BJ, Lynch J, et al. Fluorescence in situ hybridization detection of cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2004; 45(8):1595-1603.
500. Andersen MA VF, Andersen MK, Brown PN, Geisler PN, et al. Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia is a predictor of early death. *Leuk Lymphoma* 2016 Feb 5: 1-8.
501. Lai YY HX. Cytogenetic characterization of B cell chronic lymphocytic leukemia in 275 chinese patients by fluorescence in situ hybridization: a multicenter study.;*Chin Med J (Engl)*. 2011; 124(16): 2417-2422.
502. Neilson JR AR, White D, Bienz N, Waters JJ, et al. Deletions at 11q identify a subset of patients typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia* 1997; 11: 1929-1932.
503. Fegan C RH, Thompson P, Whittaker JA, White D. Karyotypic evolution in CLL. Identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia* 1995; 9: 2003-2008.
504. Dohner H SS, Fischer K, Bentz M, Litcher P. Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of B cell chronic lymphocytic leukemia: specific chromosome aberrations identify prognostic subgroups of patients and point to loci of candidate genes. *Leukemia* 1997; 11(2): S19-24.
505. Juliusson G OD, Gahrton G, for the International Working Party on Chromosomes in CLL (IWCCLL). Cytogenetic findings and survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Second IWCCLL compilation of data on 662 patients. *Leuk Lymphoma* 1991; 5: 21-25.

506. Stilgenbauer S LP, Dohner H. Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000;4(1):48-72.
507. Thornton PD G-WA, Hamoudi R, Atkinson S, Kaczmarek P, et al. Detection and characterization of p53 abnormalities in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 2001; 98(S1): 1501.
508. el Rouby S TA, Costin D, et al. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood* 1993; 82(11): 3452-3459.
509. Zenz T VD, Trbusek M, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010; 24(12): 2072-2079.
510. Geisler CH PP, Christensen BE, et al. In B-cell chronic lymphocytic leukaemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newlydiagnosed patients. *Leuk Res* 1997; 21: 1011-1023.