

**Caracterización fenotípica, citogenética y molecular de
pequeños clones de linfocitos B de individuos sanos
frente a su contrapartida maligna de la leucemia
linfática crónica B**

MSc. Ignacio Criado

Directores:

Prof. Julia Almeida
Prof. Alberto Orfão

Tesis doctoral

Salamanca, 2018



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



800 AÑOS
VNiVERSiDAD
D SALAMANCA
1218 ~ 2018



cic
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER



Dña. Julia María Almeida Parra, Doctora en Medicina y Cirugía y Profesora Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis doctoral realizado en formato de compendio de artículos bajo mi dirección por D. Ignacio Criado García y titulado "*Caracterización fenotípica, citogenética y molecular de pequeños clones de linfocitos B de individuos sanos frente a su contrapartida maligna de la leucemia linfática crónica B*", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa "Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional" de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firmo la presente certificación en Salamanca a 16 de mayo de 2018.

Fdo.: Prof. Julia María Almeida Parra



D. José Alberto Orfão de Matos Correia e Vale, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis doctoral realizado en formato de compendio de artículos bajo mi dirección por D. Ignacio Criado García y titulado "*Caracterización fenotípica, citogenética y molecular de pequeños clones de linfocitos B de individuos sanos frente a su contrapartida maligna de la leucemia linfática crónica B*", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa "Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional" de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firmo la presente certificación en Salamanca a 16 de mayo de 2018.

Fdo.: Prof. José Alberto Orfão de Matos Correia e Vale

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se ha contado con el apoyo (financiación por proyectos, utilización de infraestructuras y/o cesión de muestras) de las siguientes instituciones:

- Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad)-FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional): PI06/0824, PS09/0243, PI12/00905, DTS15/00119, PI16/00787 y PI17/00399.
- Red Temática de Investigación Cooperativa del Cáncer (RTICC, Instituto de Salud Carlos III): RD06/0020/0035 y RD12/0036/0048.
- CIBERONC (Instituto de Salud Carlos III): CB16/12/00400 y CB16/12/00233.
- Consejería de Educación y Sanidad de Castilla y León: GRS206/A/08 y SA079U14.
- Fundación a la Memoria de D. Samuel Solórzano: FS/1-2010 y FS/19-2013.
- Servicio General de Citometría (NUCLEUS) de la Universidad de Salamanca.
- Servicio de Hematología y servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca
- Banco Nacional de ADN (BNA) (NUCLEUS, Universidad de Salamanca).
- Consorcio EuroFlow-PID.

La presente tesis doctoral incluye tres trabajos originales publicados en revistas científicas indexadas en el *Science Citation Reports*, según se detalla a continuación:

1. Low-count monoclonal B-cell lymphocytosis persists after 7 years of follow-up and is associated with a poorer outcome.

Criado I¹, Rodríguez-Caballero A¹, Gutiérrez ML¹, Pedreira CE², Alcoceba M³, Nieto W¹, Teodosio C¹, Bárcena P¹, Romero A⁴, Fernández-Navarro P⁵, González M³, Almeida J¹, Orfao A¹; Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL.

Haematologica; 2018 Mar 22. doi: 10.3324/haematol.2017.183954.

2. Residual normal B-cell profiles in monoclonal B-cell lymphocytosis versus chronic lymphocytic leukemia.

Criado I¹, Blanco E¹, Rodríguez-Caballero A¹, Alcoceba M³, Contreras T⁶, Gutiérrez ML¹, Romero A⁴, Fernández-Navarro P⁵, González M³, Solano F⁷, Gómez C⁷, Pérez-Andrés M¹, van Dongen JJM⁸, Almeida J¹, Orfao A¹; EuroFlow PID group and Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL.

Leukemia 2018; manuscrito aceptado para su publicación.

3. Host virus and pneumococcus-specific immune responses in high-count monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia: implications for disease progression.

Criado I¹, Muñoz-Criado S⁹, Rodríguez-Caballero A¹, Nieto WG¹, Romero A⁴, Fernández-Navarro P⁵, Alcoceba M⁴, Contreras T⁶, González M⁴, Orfao A¹, Almeida J¹; Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL.

Haematologica. 2017 Jul;102(7):1238-1246. doi: 10.3324/haematol.2016.159012

¹Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, USAL-CSIC), Departamento de Medicina y Servicio de Citometría (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, IBSAL y CIBERONC, Salamanca, España. ²Programa de Ingeniería, Sistemas y Computación (PESC), COPPE, Universidad Federal Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil. ³Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBMCC, IBSAL, CIBERONC y Departamento de Enfermería y Fisioterapia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España. ⁴Centro de Atención Primaria de Salud Miguel Armijo, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, España. ⁵Centro de Atención Primaria de Salud de Ledesma, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, España. ⁶Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España. ⁷Servicio de Hematología, Hospital Nuestra Señora del Prado, Talavera de la Reina, Sanidad de Castilla la Mancha (SESCAM), Castilla la Mancha, España. ⁸Departamento de Inmuno-Hematología y Transfusión de Sangre, Centro Médico de la Universidad de Leiden, Universidad de Leiden, Leiden, Países Bajos. ⁹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

A mis padres.

A Elena.

“En la vida, no hay nada que temer, solo que comprender”

Marie Sklodowska-Curie

Agradecimientos

Estas líneas ponen de manifiesto el final de una etapa. Ha sido una etapa larga y costosa, que no hubiese sido posible completar sino fuese por el trabajo y apoyo que recibido de todos los compañeros, amigos y familia. Por esa razón, me gustaría dedicar unas palabras a todas aquellas personas que me han ayudado a llegar a alcanzar esta meta.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis. Agradezco a Alberto el haberme brindado la oportunidad de trabajar en un laboratorio tan multidisciplinar, en el que he podido tener contacto con gente maravillosa, de muy diferentes orígenes y formas de pensar, lo que, en mi opinión, es un gran valor añadido al excelente (y duro) trabajo que hacen todos los compañeros cada día. Me ha gustado mucho poder trabajar con una persona como tú, con una increíble capacidad de trabajo, voluntad, capaz de analizar y resolver los problemas que hemos tenido que enfrentar en esta tesis desde muy diferentes ángulos y perspectivas. Gracias por tu apoyo y tu comprensión, y por sin duda alguna haberme ayudado a superarme durante estos últimos años.

Por supuesto, mi más profundo agradecimiento a Julia por todo su apoyo, su tiempo, su energía y sus ganas. Siempre me has ayudado en absolutamente todo, desde cuando teníamos que pedir reactivos, pasando por todos los análisis estadísticos de los resultados, preparación de congresos, hasta llegar a escribir esta tesis doctoral. A pesar de tu apretadísima agenda, siempre has estado para todo lo que he necesitado, contestando a los millones de correos que te escribía, incluso en vacaciones y fines de semana. Gracias, porque sin tu apoyo incondicional este trabajo hubiese sido imposible. Ha sido todo un privilegio poder trabajar contigo.

También agradecer al “equipo MBL-CLL”, Wendy y a Arancha, que me guiaron en mis primeros años, cuando no sabía ni agarrar una pipeta, y me enseñaron, no solo las técnicas, sino también a sobrevivir en un laboratorio de investigación. Ahora le toca el turno de vivir esta experiencia a Blanca, Sara y Guillermo (¡ánimo y no desesperéis!) Gracias a todo el servicio de hematología del Hospital Clínico de Salamanca, por ayudarnos a lo largo de todo el periodo de tesis. Me gustaría agradecer especialmente a Miguel, Noemí, Chema y Marcos por su

colaboración y disponibilidad en todo momento. Me gustaría también agradecer a todos los médicos del servicio de atención primaria de Salamanca y todos los donantes que han participado en este estudio, con una mención especial para Paulino y Alfonso, que desde el primer momento me han ayudado muchísimo a ponerme en contacto con el resto de médicos, y que siempre que lo he necesitado he podido contar con ellos. Por supuesto, no me olvido de nuestros compañeros de Talavera, Fernando y Carlos, gracias por vuestra enorme dedicación, disposición, y porque da gusto trabajar con gente que derrocha ilusión por lo que hace, sois una inspiración.

Gracias a todos los compañeros del laboratorio 11 del CIC; Quentin, porque me has enseñado las maravillas de “Excel” y de “Access”, y ahora como tú discípulo difundo la palabra de “Office” y de “Infinicyt”, por tú simpatía, tú disposición y tu tranquilidad, y por tus concienzudas revisiones de las diapositivas. Gracias a Manuel, porque algún día seremos famosos, a Paula, por su enorme amabilidad, alegría y disposición, a Noemí por su simpatía.

A todos mis compañeros del edificio “inteligente” I+D+i, a todo el banco Nacional de ADN, al servicio de secuenciación, María Tablas y Lola, a Paloma, Mariluz y Sheila, porque sin su trabajo estos resultados no hubiesen sido posibles, a Laurix y Virginia, por su disposición para trabajar y para enseñar, a Javi y a Carolina, porque con vuestra alegría ayudáis a que todo sea un poquito más fácil, a Toño y a Juana, que siempre han tenido tiempo para mostrarme un poquito de todo ese enorme conocimiento que tienen. Gracias a las técnicas, Mirian Fierro, Miriam Santos, Rebeca y por supuesto también Rosana. A Martín por estar siempre pendiente de que nos formemos, a Juan Flores, por introducirme en ese maravilloso mundo llamado “compensación y calibración”, del que sin su ayuda nunca hubiese podido salir. A mis antiguos compañeros de sala, a Lourdes y Susana, porque me he reído mucho con vosotras, aunque hayáis favorecido enormemente el calentamiento global, a Sergio, gracias por tú alegría contagiosa, a Carlos, por tú amabilidad y cercanía, a Alejandro, porque todavía tengo mucho que aprender de tu tranquilidad, a Pilar, que siempre está dispuesta a colaborar con todos.

Por supuesto, a Vitor, porque eres una de las mejores personas que he conocido nunca, por tu trabajo, amabilidad, compañerismo, y por esos “Ruedas”. Tampoco me olvido de Alex, mi chileno favorito (Krav Maga!), que ha dejado huella profunda.

A mis compis del “coffee break”, a Guille, gracias por todos esos momentos de risas con los pinchos de Abundio, a Nacho (Zooorrooo), por tú positivismo y confianza, a Andrea, porque en un café podemos resolver los problemas del laboratorio (y del mundo), a Daniela por su alegría, y a los que ya no pueden venir, a las Marías, “Jareitor” y “Yoda”, que me habéis ayudado siempre que habéis podido, y además sois muy directas, y eso, mola. A Albita, que además de ser una de las personas más resolutivas que conozco, siempre está ahí para lo que se necesite. Por supuesto, agradezco a Crispi todo su apoyo, su cariño y su paciencia, porque se que sin sus enseñanzas esta tesis hubiese sido mucho más difícil.

Tampoco me olvido de mis compañeros After-Work, gracias a Noelia por sus gestos de amistad, a Luz, porque al final, chama, todo sale chévere.

Por último, me gustaría agradecer y dedicar este trabajo a mi familia. A mis padres, que han hecho posible que haya podido llegar hasta aquí, que han sido responsables de inculcarme la curiosidad y el esfuerzo que requiere la investigación, y por haberme apoyado y comprendido siempre en los momentos de desazón.

A Elena, que ha sido el mejor descubrimiento que he hecho durante la tesis y el mejor que haré en toda mi vida. Hemos sido compañeros de este viaje, casi lo empezamos juntos, y como formamos un gran equipo, también lo vamos a terminar juntos (“lo que ha unido la citometría, no lo separe el hombre”). Gracias por tú cariño, comprensión y apoyo incondicional, tu sinceridad, por tú forma de ser, y por quererme.

Índice general

Introducción	1
1. Ontogenia de los linfocitos B	3
1.1. Maduración B independiente de antígeno (Ag)	3
1.2. Maduración B dependiente de Ag.....	7
1.2.1. Maduración B dependiente de Ag en órganos linfoides secundarios (OLS).....	7
1.2.2. Características inmunofenotípicas de las células B efectoras.....	9
1.3. Principales vías de señalización de los linfocitos B.....	11
1.3.1. Señalización a través del receptor de célula B (BCR).....	12
1.3.2. Activación a través del correceptor de BCR CD19-CD21-CD81-CD225.....	13
1.3.3. Moduladores negativos de la respuesta B.....	15
1.3.4. Otras vías de activación relevantes en linfocitos B.....	16
2. Linfocitosis B monoclonal (LBM)	18
2.1. Definición de LBM.....	18
2.2. Identificación de linfocitos B clonales en sangre periférica de sujetos con LBM.....	18
2.3. Criterios diagnósticos de LBM	19
2.4. Clasificación de la LBM.....	19
2.4.1. Clasificación de la LBM según el número absoluto de linfocitos B clonales de SP.....	19
2.4.2. Clasificación fenotípica de la LBM	20
2.4.3. Clasificación de la LBM en función del número de clones B detectados	21
2.5. Prevalencia de la LBM	21
2.5.1. Prevalencia de LBM en población adulta sana.....	21
2.5.2. Prevalencia de LBM en pacientes no hematológicos con linfocitosis.....	26
2.5.3. Prevalencia de LBM en familiares de pacientes diagnosticados de LLC	26
3. Leucemia linfática crónica B (LLC)	27
3.1. Definición	27
3.2. Criterios diagnósticos.....	28
3.3. Incidencia y prevalencia.....	28
3.4. Características clínicas	29
3.5. Características morfológicas y fenotípicas	32
3.6. Alteraciones genéticas.....	33
3.7. BCR y vías de señalización mediadas por BCR y otros receptores de membrana e intracelulares	35
3.8. Clasificación pronóstica de la LLC.....	39

4. Relación ontogénica entre LBM y LLC	45
4.1. Características citogenéticas y moleculares de la LBM vs. LLC	45
4.2. Características clínicas de la LBM vs. LLC	47
4.3. Progresión de LBM a LLC.....	48
4.4. Origen celular de la LBM y la LLC	50
Hipótesis de trabajo y objetivos	57
Material, métodos y resultados	63
Artículo 1: “La linfocitosis B monoclonal de bajo recuento persiste tras 7 años de seguimiento y se asocia a menor supervivencia”.....	67
Artículo 2: “La linfocitosis B monoclonal y la leucemia linfática crónica muestran diferentes perfiles de distribución de los linfocitos B normales residuales de sangre periférica”	83
Artículo 3: “Respuesta inmune específica frente a virus recurrentes y <i>S.pneumoniae</i> en linfocitosis B monoclonal y leucemia linfática crónica: implicaciones en la progresión de la enfermedad”.....	93
Discusión	107
Conclusiones	127
Referencias bibliográficas	133
Anexo I	169

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A.

ABF-1: factor de célula B activada tipo 1 (del inglés: “*activated B-cell factor 1*”).

Ac: anticuerpo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNcs: ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla.

ADNdc: ácido desoxirribonucleico de cadena doble.

Ag: antígeno.

AHA: anemia hemolítica autoinmune.

AID: enzima citidina deaminasa inducida tras activación (del inglés: “*activation-induced cytidine deaminase*”).

AIM1: gen / proteína 1 ausente en melanoma (del inglés: “*absent in melanoma protein 1*”).

Akt: gen / proteína quinasa B.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ATM: gen / proteína de la ataxia telangiectasia.

B.

Bam32: proteína adaptadora 32 asociada a linfocitos B (del inglés: “*B lymphocyte-associated adaptor protein 32*”).

Bcl-2: proteína del “linfoma de células B tipo 2” (del inglés: “*B-cell lymphoma 2*”).

Bcl-6: proteína del “linfoma de células B tipo 6” (del inglés: “*B-cell lymphoma 6*”).

BCOR: gen / proteína correpresora de BCL6 (del inglés: “*BCL6 corepressor*”).

BCR: receptor de célula B (del inglés: “*B-cell receptor*”).

BIRC3: gen / proteína baculovírica que contiene repeticiones IAP tipo 3 (del inglés: “*baculoviral IAP Repeat Containing 3*”).

Blk: proteína tirosina quinasa Blk (del inglés: “*tyrosine-protein kinase Blk*”).

Blnk: gen / proteína de unión de células B (del inglés: “*B-cell linker*”).

Btk: gen / proteína quinasa de Bruton (del inglés: “*Bruton’s tyrosine kinase*”).

C.

CCR6: receptor de quimiocinas tipo C-C 6.

CD: *cluster* (o grupo) de diferenciación (del inglés: “*cluster of differentiation*”).

CDF: célula dendrítica folicular.

CDK4: quinasa dependiente de ciclina tipo 4 (del inglés: “*cyclin-dependent kinase 4*”).

CDR: región determinante de complementariedad (del inglés: “*complementary determining region*”).

CG: centro germinal.

CHD2: gen que codifica el dominio de unión a DNA con función helicasa tipo 2 (del inglés: *chromodomain-helicase-DNA-binding domain 2*).

CI: cambio isotópico.

cilg: inmunoglobulina expresada en el citoplasma de la célula.

c-Kit: receptor del factor estimulante de células madre.

CLS: cadena ligera subrogada.

CMH: célula madre hematopoyética.

CMV: citomegalovirus.

CP: célula plasmática.

CSK: gen / proteína C-terminal de quinasas Src (del inglés: "*C-terminal Src kinases*").

CXCL12: quimiocina tipo C-X-C 12.

CXCR4: receptor de quimiocinas tipo C-X-C 4.

D.

DAG: diacilglicerol.

DDX3X: gen / proteína ARN helicasa ATP dependiente tipo DDX3X.

DYRK1A: gen / proteína quinasa 1A con especificidad dual reguladora de fosforilación de tirosina (del inglés: "*dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A*").

E.

EBF1: factor de transcripción B temprano tipo 1 (del inglés: "*early B-cell factor 1*").

ECOG: sistema de clasificación de comorbilidades del grupo cooperativo en oncología del este de EEUU (del inglés: "*Eastern cooperative oncology group*").

EEUU: Estados Unidos de América.

e.g.: por ejemplo (del latín: "*exempli gratia*").

EGR2: gen / proteína de respuesta a crecimiento temprano tipo 2 (del inglés: "*early growth factor response protein 2*").

ELISA: inmunoensayo ligado a enzima (del inglés: "*enzyme-linked immuno assay*").

Erk: quinasas reguladas por señales extracelulares (del inglés: "*extracellular signal-regulated kinases*").

F.

FBXW7: gen / proteína que contiene dominios caja F y repeticiones WD tipo 7 (del inglés: "*F-box and WD repeat containing domains 7*").

FUBP1: gen / proteína de unión a la proteína elemento tipo 1 lejana (del inglés: "*far upstream binding element protein 1*").

Fyn: proteína tirosina quinasa Fyn (del inglés: "*tyrosine-protein kinase Fyn*").

G.

GAP: proteína activadora de GTPasas (del inglés: “*GTPase-activating protein*”).

GEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina (del inglés: “*guanine nucleotide exchange factor*”).

GL: ganglio linfático.

H.

HIST1H1E: miembro E del grupo de histonas tipo 1 H1 (del inglés: “*histone cluster 1 H1 family member E*”).

HLA: antígeno leucocitario humano (del inglés: “*human leukocyte antigen*”).

HMS: hipermutación somática.

HTLV-1: virus linfotrópico T humano tipo 1 (del inglés: “*human T-lymphotropic virus 1*”).

I.

i.e.: esto es (del latín: “*id est*”).

iFISH: hibridación “in situ” fluorescente sobre núcleos interfásicos (del inglés: “*interphase fluorescence in situ hybridization*”).

Ig: inmunoglobulina.

IGH: cadena pesada de las inmunoglobulinas (del inglés: “*immunoglobulin heavy chain*”).

IGHD: segmento de diversidad (D) de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (del inglés: “*immunoglobulin heavy chain D segment*”).

IGHJ: segmento de unión (J) de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (del inglés: “*immunoglobulin heavy chain J segment*”).

IGHV: segmento de variabilidad (V) de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (del inglés: “*immunoglobulin heavy chain V segment*”).

IGHVm: región variable del receptor de célula B mutado (<98% de identidad con respecto a línea germinal).

IGHVnm: región variable del receptor de célula B, no mutado (≥98% de identidad con respecto a la línea germinal).

Iglv: inmunoglobulina intravenosa.

IGK: cadena ligera de inmunoglobulina Kappa (del inglés: “*immunoglobulin Kappa chain*”).

IGL: cadena ligera de inmunoglobulina Lambda (del inglés: “*immunoglobulin Lambda chain*”).

IGLig: cadena ligera de inmunoglobulina.

IgSc: inmunoglobulina subcutánea.

IL: interleuquina.

IP₃: inositol-(1,4,5)-trisfosfato.

IPI: índice pronóstico internacional.

IRF4: factor regulador de interferón tipo 4 (del inglés: “*interferon regulatory factor 4*”).

ITAM: motivos de activación basados en inmunorreceptores con tirosina (del inglés: “*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*”).

ITIM: motivos de inhibición basados en inmunorreceptores con tirosina (del inglés: “*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*”).

ITPKB: inositoltrifosfato 3 quinasa tipo B (del inglés: “*inositol-trisphosphate 3-kinase B*”).

J.

Jak3: tirosina quinasa Janus 3 (del inglés: “*Janus kinase 3*”).

K.

KLHL6: gen / proteína tipo Kelch 6 (del inglés: “*Kelch-like protein 6*”).

KRAS: protooncogen del virus del sarcoma de rata Kirsten (del inglés: “*Kirsten rat sarcoma virus*”).

L.

LBM: linfocitosis B monoclonal.

LBM^{lo}: linfocitosis B monoclonal de bajo recuento.

LBM^{hi}: linfocitosis B monoclonal de alto recuento.

LCM: linfoma de células del manto.

LLC: leucemia linfática crónica de células B.

LLCP: linfoma linfocítico de célula pequeña.

LRP1B: gen / proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad tipo 1B (del inglés: “*low density lipoprotein receptor-related protein 1B*”).

LTcf: linfocitos T colaboradores foliculares.

Lyn: proteína quinasa Lyn (del inglés: “*Lck/Yes novel tyrosine*”).

LZM: linfoma de zona marginal.

M.

MALT: tejido linfoide asociado a mucosas (del inglés: “*mucosa-associated lymphoid tissue*”).

MAPK1: gen / proteína quinasa activada por mitógenos tipo 1 (del inglés: “*mitogen activated protein kinase 1*”).

MDR: región mínima delecionada (del inglés: “*minimal deleted region*”).

MED12: subunidad 12 del complejo mediador (del inglés: “*mediator complex subunit 12*”).

MGA: proteína de dimerización MAX.

MLL: gen / proteína mieloid/linfoide o de la leucemia de linaje mixto (del inglés: “*myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia*”).

MO: médula ósea.

MYD88: proteína de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (del inglés: “*myeloid differentiation primary response 88*”).

MYHIIA: cadena pesada de la miosina no muscular tipo IIA (del inglés: “*non muscle myosin IIA*”).

N.

NFAT: factor nuclear de células T activadas (del inglés: “*nuclear factor of activated T cells*”).

NF-κB: factor nuclear κB (del inglés: “*nuclear factor-κB*”).

NGS: técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (del inglés: “*next generation sequencing*”).

NK: células “natural killer”.

NXF: factor de exportación nuclear de ARN tipo 1 (del inglés: “*nuclear RNA export factor 1*”).

O.

OLS: órgano linfóide secundario.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

P.

PAMP: patrón molecular asociado a patógeno (del inglés: “*pathogen-associated molecular pattern*”).

Pax-5: factor de transcripción tipo “caja-pareada” 5 (del inglés: “*paired-box protein Pax-5*”).

PEG: perfil de expresión génica.

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa (del inglés: “*phosphoinositol 3-kinase*”).

PI3KCA: subunidad catalítica alfa de la fosfoinositol 3-quinasa (del inglés: “*phosphoinositol 3-kinase catalytic alpha subunit*”).

PKC: proteína quinasa C (del inglés: “*protein kinase C*”).

PLC: precursor linfóide común.

PLCγ2: fosfolipasa Cγ2 (del inglés: “*phospholipase Cγ2*”).

POT1: gen / proteína de protección de los telómeros tipo 1 (del inglés: “*protection of telomeres 1*”).

PTPN11: gen / proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 11 (del inglés: “*protein-tyrosine phosphatase non-receptor type 11*”).

pUL32: proteína tegumentaria UL32 de citomegalovirus.

R.

Rag1/rag2: genes / proteínas activadoras de la recombinación tipo 1 y tipo 2 (del inglés: “*recombination-activating gene*”).

RB1: gen del retinoblastoma tipo 1.

RIPK1: gen / proteína serina/treonina quinasa que interacciona con receptor tipo 1 (del inglés: “*receptor-interacting Serine/Threonine-protein kinase 1*”).

RPS15: gen / proteína ribosomal S15 (del inglés: “*ribosomal protein S15*”).

S.

SAMHD1: gen / proteína que contiene dominios SAM y HD tipo 1 (del inglés: “*SAM domain and HD domain-containing protein 1*”).

SCF: factor estimulador de células madre (del inglés: “*stem cell factor*”).

SF3B1: subunidad 1 del factor de *splicing* 3B1 (del inglés: “*splicing factor 3B 1*”).

SG: supervivencia global.

SHP-1: proteína fosfatasa con dos dominios homólogos a Src tipo 1 (del inglés: “*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*”).

SHP-2: proteína fosfatasa con dos dominios homólogos a Src tipo 2 (del inglés: “*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2*”).

slg: inmunoglobulina expresada en la superficie de la célula.

SLPC-B: síndrome linfoproliferativo crónico de células B.

SNP: polimorfismo de nucleótido único (del inglés: “*single nucleotide polymorphism*”).

SP: sangre periférica.

Src: familia de proteínas tirosina quinasa de tipo sarcoma virus.

STAT5: transductor de señales y activador transcripcional tipo 5 (del inglés: “*signal transducer and activator of transcription 5*”).

STAT6: transductor de señales y activador transcripcional tipo 6 (del inglés: “*signal transducer and activator of transcription 6*”).

Syk: proteína quinasa de bazo (del inglés: “*spleen tyrosine kinase*”).

T.

TAC1: activador transmembrana que interactúa con CAML (del inglés: “*transmembrane activator and CAML interactor*”).

TAI: trombocitopenia autoinmune.

Tdt: enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (del inglés: “*terminal deoxynucleotidil transferase*”).

TL: tricoleucemia.

TLR: receptor tipo *Toll* (del inglés: “*Toll-like receptor*”).

TP53: gen / proteína tumoral p53 (del inglés: “*tumoral protein 53*”).

TRAF: factor asociado a los receptores de tipo TNF (del inglés: “*TNF receptor-associated factor*”).

TT: tiempo hasta tratamiento.

V.

Vav: proteína factor intercambiador de nucleótidos de guanina Vav.

VCA: antígeno de la cápside del virus de Epstein-Barr (del inglés: "*viral capsid antigen*").

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular tipo 1 (del inglés: "*vascular cell adhesion molecule-1*").

VEB: virus de Epstein-Barr.

VLA-4: antígeno muy tardío tipo 4 (del inglés: "*very late antigen-4*").

W.

Wnt: vía de señalización "wingless".

X.

XPO1: gen/ proteína exportina tipo 1 (del inglés: "*exportin-1*").

Z.

ZAP-70: proteína quinasa asociada a la cadena zeta (ζ) del receptor de célula T de 70KDa (del inglés: "*zeta-chain-associated protein kinase 70*").

ZC: zona clara del centro germinal.

ZM: zona marginal.

ZMYM3: gen / proteína dedo de zinc tipo 3 con dominios tipo "MYM" (del inglés: "*zinc-finger MYM-type containing 3*").

ZO: zona oscura del centro germinal.

Introducción

1. ONTOGENIA DE LOS LINFOCITOS B

Los linfocitos B tienen su origen en la médula ósea (MO) a partir de progenitores hematopoyéticos, que a su vez son responsables de producir muchos otros tipos celulares, en un proceso estrictamente regulado, que es la hematopoyesis.¹ Tan solo aquellos linfocitos B, que tras sucesivas etapas de desarrollo muestren un fenotipo maduro y expresen un receptor de célula B (BCR) no autorreactivo, son capaces de alcanzar la sangre periférica (SP), desde donde poblarán los órganos linfoides secundarios (OLS).^{2,3} Es (fundamentalmente) en los OLS donde los linfocitos B maduros, gracias a la gran diversidad en el repertorio de su BCR, son capaces de reconocer de manera específica antígenos (Ags) de muy diversa naturaleza y origen. El contacto específico Ag-BCR, junto con otras señales accesorias, como describiremos con más detalle en secciones posteriores de esta memoria, son responsables de la activación de estas células, favoreciendo su supervivencia, proliferación, y en última instancia, su maduración funcional.⁴

En conjunto, todos estos procesos integran la maduración del linfocito B, que puede dividirse en dos grandes etapas: maduración independiente de Ag que tiene lugar en la MO, y maduración dependiente de Ag que ocurre en los OLS y la SP.

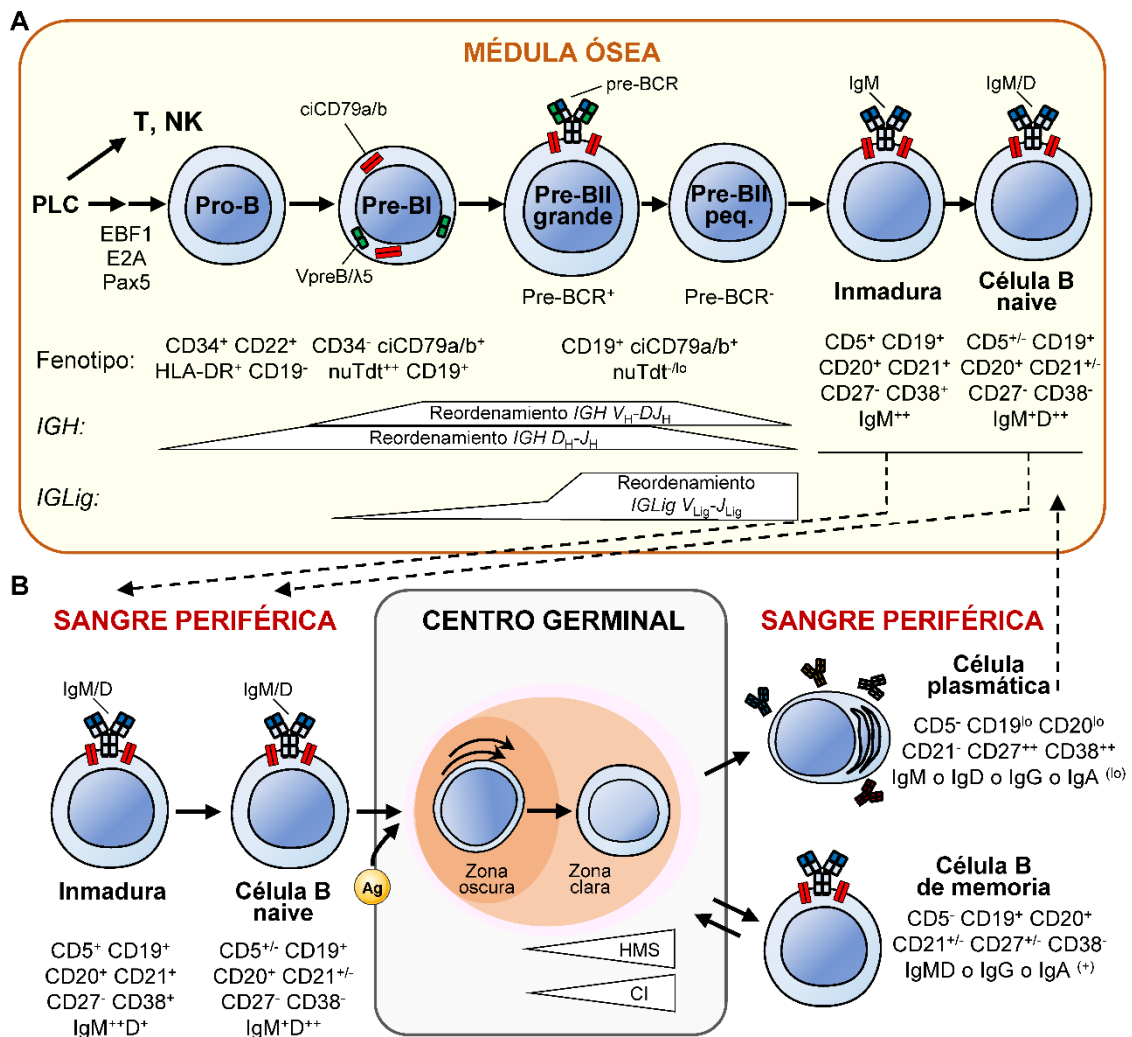
1.1. Maduración B independiente de antígeno (Ag)

Las células madre hematopoyéticas de MO tienen capacidad de autorrenovación y pueden diferenciarse para dar lugar a diferentes líneas celulares (i.e. células pluripotenciales) entre las que se encuentran las líneas eritroide, megacariocítica, linfoide y mieloide.¹ Los precursores celulares específicos de cada una de estas líneas pierden de manera progresiva la capacidad de autorrenovación y diferenciación a otras líneas celulares (i.e. células multipotenciales), a la vez que muestran cambios fenotípicos.⁵ Entre estas células, se encuentra el precursor linfoide común (PLC), responsable de dar lugar a los linfocitos T, B y las células natural killer (NK).^{6,7} A pesar del esfuerzo realizado hasta la fecha, seguimos sin conocer con precisión en el ser humano el/los lugar(es) físico(s) –i.e. nicho(s)– o las moléculas concretas que están implicadas en el proceso de diferenciación de este precursor de linfocitos B, ya que la mayor parte de los estudios realizados hasta la fecha se han llevado a cabo en modelos murinos,

que (a pesar de su similitud) presentan diferencias significativas con respecto a la maduración B humana.⁸⁻¹²

Según el estado de los genes de cadena pesada (*IGH*) y cadena ligera de inmunoglobulina (*IGLig*), así como la expresión diferencial de una gran cantidad de proteínas (inmunofenotipo), podemos identificar al menos 5 estadios madurativos B diferentes en la MO: célula Pro-B, Pre-BI, Pre-BII, linfocito B inmaduro y linfocito B naíve (Figura 1A).^{2,13,14}

Figura 1 | Esquema del proceso de diferenciación linfocito B.



(A) Representación esquemática de la maduración B independiente de antígeno que tiene lugar en la médula ósea, así como el fenotipo de cada uno de los estadios madurativos y el estado del reordenamiento de los genes de cadena pesada (*IGH*) y cadena ligera de las Igs (*IGLig*). (B) Representación esquemática de la maduración B dependiente de antígeno, así como de los principales eventos que tienen lugar en el centro germinal y el fenotipo característico en los diferentes estadios madurativos B.

Las **células Pro-B** constituyen el estadio de desarrollo más incipiente en la maduración linfocito B.^{2,10} El contacto de las células Pro-B a través de los receptores VLA-4 (CD49d), c-Kit (CD117) y CXCR4 (CD184) con sus respectivos ligandos, VCAM-1 (CD106) y SCF (expresados

en la superficie de las células del estroma medular), y la citocina CXCL12 (producida por estas mismas células estromales),¹⁵⁻¹⁸ son responsables de generar la primera señal de diferenciación y compromiso a línea linfocítica B, mediante la activación y producción de factores de transcripción específicos como E2A, Pax5 y EBF-1, entre otros.¹⁹⁻²² Durante esta etapa, se inicia el reordenamiento del gen *IGH* con la selección al azar y fusión de un segmento (de la región variable) D_H , con un segmento (de la región variable) J_H .^{23,24} Para que pueda tener lugar este proceso de reordenamiento es necesaria la presencia de las enzimas rag1 y rag2, responsables de la selección de los segmentos génicos que van a ser fusionados, así como de la enzima Tdt, encargada de la introducción de nucleótidos al azar (i.e. nucleótidos N) en las regiones donde se produce la fusión entre los dos segmentos génicos seleccionados.²⁵ Desde el punto de vista fenotípico, además de la presencia de Tdt nuclear (nuTdt), estas células se caracterizan por la expresión de CD34⁺, CD79a⁺ citoplasmático (ciCD79a), CD22⁺ y HLADR⁺, en ausencia del marcador pan-B CD19.²⁴

Durante la fase **Pre-BI** se inicia el reordenamiento de un segmento variable V_H con el segmento D_H-J_H reordenado, dando como resultado el reordenamiento completo de la región variable del gen *IGH*.^{23,24} Durante esta etapa, los precursores B comienzan a expresar por primera vez CD19 en su superficie, asociado con la expresión de ciCD79a⁺, CD22⁺, HLADR⁺ y CD10⁺.²⁴ Las células pre-BI muestran niveles elevados de rag1/rag2 y Tdt, lo que en parte explica la existencia de una mayor diversidad en las secuencias de los genes *IGH* con respecto a las *IGLig*, cuyo reordenamiento se producirá posteriormente.²⁴ El producto del gen *IGH* reordenado (I μ) se asocia con un heterodímero formado por los péptidos VpreB (CD179a) y $\lambda 5$ (CD179b), dos péptidos que son homólogos estructurales de los dominios variable y constante de las cadenas ligeras de inmunoglobulina y que conforman la cadena ligera subrogada (CLS). El complejo I μ -CLS se expresa en la superficie del precursor B junto con I α /I β (i.e. CD79a/CD79b), conformando el denominado "precursor del receptor de célula B" (pre-BCR).²⁶⁻
²⁸ Las señales generadas por este pre-BCR son responsables de la gran proliferación celular que se produce durante el desarrollo del linfocito B.²⁹ Además, esta señal es esencial para que pueda continuar la maduración linfocítica B, y se considera un "checkpoint" en el que se valida la funcionalidad del reordenamiento de la cadena pesada. Asimismo, la señalización a través del pre-BCR bloquea el reordenamiento del segundo alelo del gen *IGH* (i.e. exclusión alélica),³⁰

favoreciendo a su vez, el inicio del reordenamiento de los genes de la cadena ligera Kappa (*IGK*);³¹ esto supone la entrada en la fase pre-BII.

Durante la fase **pre-BII**, se produce el reordenamiento de la cadena ligera de inmunoglobulina, de una manera similar a la observada para *IGH*; sin embargo, la cadena ligera solo presenta segmentos *V* y *J* en su región variable, de manera que el reordenamiento se produce en un único paso. Si se produce un reordenamiento funcional de *IGK*, ya es posible formar una inmunoglobulina (Ig) completa (i.e. BCR). En el caso de que el reordenamiento de la cadena ligera no fuese funcional, se puede reordenar el segundo alelo del gen *IGK*. Si aun así este segundo reordenamiento tampoco fuese funcional, todavía se podrían reordenar los genes de la cadena ligera Lambda (*IGL*). Solo aquellas células que han sido capaces de reordenar la cadena ligera de manera satisfactoria comienzan a expresar un BCR formado por la combinación del producto de *IGH* y de *IGLig*, alcanzándose la fase de linfocito B inmaduro. Durante la fase pre-BII podemos identificar dos tipos celulares en función de su morfología y de la expresión o no del pre-BCR: células pre-BII "grandes" y "pequeñas", cuyo inmunofenotipo es muy similar (CD34⁻, CD19⁺, CD20^{-/+}, CD22⁺, CD10⁺, CD38⁺⁺, ciCD79a⁺, nuTdt^{lo}).²⁴

Los **linfocitos B inmaduros** deben someterse a un segundo "checkpoint", que asegure por una parte que el BCR producido es funcional (es decir, que es capaz de transmitir señal al interior de la célula: selección positiva), y que además no reconoce Ags propios del organismo (selección negativa). El proceso de selección negativa asegura la identificación y eliminación de las células B autorreactivas, y es uno de los mecanismos fundamentales para mantener la tolerancia a los Ags propios (inmunotolerancia central).³²⁻³⁵ No obstante, las células con BCRs autorreactivos tienen una segunda oportunidad para reordenar su loci *IGLig*, y de esta manera "reeditar" su BCR, con el objetivo de perder la autorreactividad. Si tras el proceso de "edición del receptor", el BCR de estas células sigue siendo autorreactivo, son inducidas a morir por apoptosis o quedan en un estado de incapacidad funcional (i.e. anergia).³²⁻³⁶ Fenotípicamente, estas células B ya presentan en su superficie una Ig completa (i.e. compuesta por cadenas ligeras y pesadas), y expresan de manera intensa el isotipo de cadena pesada M (IgM⁺⁺); además son CD19⁺, CD20⁺, CD10⁺⁺ y CD38⁺⁺. A partir de este punto comienzan a perderse la expresión de CD38^{lo} y CD10^{lo}, las células B adquieren positividad para CD20^{hi}, CD5⁺ y sIgM⁺, junto a expresión progresivamente mayor de sIgD^{-/+}, hasta alcanzar el fenotipo típico del **linfocito B maduro**

naive: nuTdt⁻ cCD79a⁺ CD22^{hi} HLADR⁺ CD34⁻ CD38^{-/lo} CD10⁻ CD19⁺ CD20^{hi} sIgM⁺D⁺⁺ CD5^{-/+}.^{24,37} Tanto las células inmaduras como las células B naive se encuentran ya presentes en la SP.³⁸

1.2. Maduración B dependiente de Ag

La maduración dependiente de Ag tiene como objetivo la diferenciación funcional de los linfocitos B, es decir, dar como resultado células con características especiales, responsables de generar una defensa específica frente a un determinado Ag, que además se mantiene en el tiempo (i.e. genera y posee memoria inmunológica). Este proceso tiene lugar fundamentalmente en los OLS, y como consecuencia del mismo se producen dos tipos celulares diferentes: células plasmáticas y linfocitos B de memoria. En esta sección describiremos el proceso de maduración B dependiente de Ag, así como de las principales características inmunofenotípicas de las células producidas (Figura 1B).

1.2.1. Maduración B dependiente de Ag en órganos linfoides secundarios (OLS)

Los linfocitos B naive recién producidos en la MO circulan a través de la sangre hasta alcanzar los OLS (e.g. los ganglios linfáticos o el bazo) encargados de filtrar y concentrar los Ags que penetran en el organismo. En ausencia del Ag específico, el linfocito B naive recircula entre la SP y los OLS, y finalmente acaba muriendo al cabo de varios días. Por el contrario, si el linfocito B es capaz de reconocer de forma específica un Ag a través de su BCR, se producirán señales que conducen a su proliferación y maduración a células efectoras. El reconocimiento del Ag suele tener lugar en los OLS, en el área localizada entre el folículo primario y la zona T.^{39,40} El reconocimiento antigénico por parte del linfocito B y de linfocitos T en el OLS, provoca una primera fase proliferativa fuera del folículo linfoide. Parte de estas células inician su migración hacia el interior del folículo primario, lo cual conduce a la formación de un centro germinal (CG) inmaduro.⁴¹ El CG está compuesto por dos regiones histológicamente bien diferenciadas, denominadas zona oscura (ZO) y zona clara (ZC). La ZO se caracteriza por la presencia casi en exclusividad de linfocitos B altamente proliferativos (centroblastos). En esta área es dónde se producen los fenómenos de hipermutación somática (HMS) y cambio isotípico (CI), que conducen a un intento por generar anticuerpos con más afinidad por el Ag (maduración de

afinidad) y a desarrollar una respuesta acorde a la naturaleza del antígeno, seleccionando el tipo de cadena pesada de Ig que se secretará posteriormente.^{4,42-44} Por el contrario, la ZC está constituida por una gran diversidad de tipos celulares, entre los que destacamos células dendríticas foliculares (CDF), linfocitos T colaboradores foliculares (LTcf), células B naive y células B procedentes de la ZO (que por las características morfológicas que adquieren en la ZC, pasan a denominarse centrocitos).⁴⁵ En la ZC tienen lugar los procesos de selección positiva y negativa, y la producción de células efectoras (células plasmáticas y linfocitos B de memoria).

A pesar de que en los últimos 10 años nuestro conocimiento sobre el CG ha aumentado significativamente, aún son muchos los mecanismos fundamentales de los procesos de selección y maduración B que desconocemos. En la ZO, los centroblastos expresan niveles elevados de la enzima AID y de la polimerasa Pol(v), responsables de la introducción de variabilidad en la secuencia que codifica para la región variable de la Ig.^{42,46} En el modelo más aceptado en la actualidad, la ZC está continuamente repoblándose con células procedentes de la ZO (el 50% de las células de la ZO pasan a la ZC en un periodo de 6 horas).^{47,48} Estas células comprueban la afinidad de sus nuevos BCRs por el Ag, al ponerse en contacto con las CDFs, las cuales son verdaderos reservorios de Ags, esenciales tanto para la maduración de afinidad del BCR como para el mantenimiento a largo plazo del CG.^{49,50} El reconocimiento del Ag (presentado por la CDF) a través del BCR genera una primera señal en las células B del CG. Sin embargo, esta señal no es lo suficientemente fuerte como para activar al factor de transcripción NF-κB, conllevando por tanto a una activación parcial de la célula B.^{47,51,52} Gracias a la capacidad del BCR, no solo de reconocer Ag, sino también de “secuestrarlo” y procesarlo para que sea expresado en la superficie del linfocito B en moléculas HLA de clase II, se produce la activación de los LTcf circundantes, específicos del mismo Ag. En el modelo actual, la afinidad del BCR de un linfocito B se mediría en función de la densidad de moléculas HLA de clase II cargadas con el antígeno que se expresan en ese linfocito B; así, los BCRs con mayor afinidad serían los que recogerían más cantidad de Ag de la superficie de la CDF, y por tanto, los que expresarían una mayor densidad de complejos HLA-II+Ag en su superficie. La señalización entre el linfocito B y el linfocito T, a través del eje CD40-CD40L, genera un ciclo de retroalimentación positiva, que conduce a la proliferación y maduración B.^{4,43,48} Aproximadamente 10-30% de las células B de la ZC vuelven a la ZO para repetir nuevos ciclos de maduración de afinidad. El resto de las células

(70%-90%) son eliminadas, bien porque no reconocen Ag o reconocen Ag propios, o bien porque el grado de afinidad de su BCR por el Ag no es lo suficientemente elevado.

A su vez, las células B del CG que han incrementado su afinidad por el Ag y que han recibido una estimulación fuerte por parte de los LTcf, van a expresar niveles más elevados de IRF4. La sobreexpresión de IRF4 conduce a la activación de Blimp1, considerado como el factor de transcripción clave para la maduración hacia célula plasmática (CP).^{44,53-56} Blimp1 estimula una mayor producción de IRF4 y XBP1, asociado a la disminución de Pax5, AID y Bcl6, entre otros.^{57,58} Por un lado, XBP1 potencia la expresión de CXCR4 (CD184), que guía la migración de estas células, primero hacia la ZO y posteriormente fuera del CG e incluso fuera del órgano linfoide; por otro lado, XBP1 favorece la producción masiva de Ig, función clave de las CPs.⁵⁹

A diferencia de las CPs, todavía no se conoce cuál puede ser el factor o los factores de transcripción clave en la diferenciación a linfocito B de memoria. No obstante, se sabe que los linfocitos B de memoria producidos en el CG presentan menor grado de HMS con respecto a las CPs, lo cual se ha asociado a una menor afinidad por el Ag por parte de las células B de memoria. Una de las hipótesis propuestas es que las células del CG con una afinidad intermedia (menor que la de las CPs, pero superior a la mínima requerida para no ser eliminada) conducirían a la producción de linfocitos B de memoria.⁶⁰ Muy recientemente se ha propuesto que el receptor de quimiocinas CCR6 (CD196) podría constituir un marcador clave en la diferenciación B en el CG a célula de memoria.⁴⁴ La producción masiva de CCR6 es consecuencia de la activación de ABF-1 (tras estimulación mediada por IL-21 y CD40),⁶¹ que induce efectos opuestos a los generados por Blimp1. Por tanto, existen dos vías de maduración independientes (demostrado tanto desde el punto de vista de los perfiles de expresión génica como espacialmente) para las CPs y los linfocitos B de memoria.⁶²

1.2.2. Características inmunofenotípicas de las células B efectoras

Células plasmáticas. En la SP de individuos sanos se puede identificar de manera sistemática la presencia de pequeñas poblaciones de células CD19⁺ CD27⁺⁺ CD38⁺⁺ CD20^{-/+} CD43⁺ y CD143⁻, con niveles de expresión débiles de Ig de membrana, y que representan 1-3% de todas las células B (aproximadamente 1-5 células/ μ L en SP de adultos).^{38,63,64} Se cree que estas células corresponden a CPs recién producidas (plasmoblastos) que viajan a través de la

SP hacia sus nichos definitivos en la MO u otros órganos linfoides secundarios. Una vez alcanzan estos órganos, deben competir con las células residentes en los mismos, por los factores generados en estas áreas específicas, y que son fundamentales para su supervivencia.^{63,65,66} La función de estas células plasmáticas es la de producir anticuerpos específicos frente a los Ags con los que han contactado, y frente a los cuales se ha generado la respuesta inmunológica. Por tanto, las CPs son las responsables del mantenimiento de los niveles de Ig en el organismo. La mayoría de las CP circulantes de SP expresan en su membrana sIgA (49%), seguido de sIgM (18%) e sIgG (13%), mientras que un 14% de ellas no expresan ninguna Ig de superficie. Posiblemente, la mayor proporción de CPs circulantes sIgA⁺ se deba a que tienen su origen en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), especialmente del tracto digestivo, que es donde se generarían las respuestas con producción de anticuerpos frente a bacterias comensales.^{38,64,67}

Linfocitos B de memoria. Los linfocitos B de memoria suponen aproximadamente 20-30% de todos los linfocitos B de SP de adultos sanos.^{38,68-70} Tienen una capacidad de respuesta frente a estímulos antigénicos mucho más rápida que los linfocitos B inmaduros y naive, gracias en parte a que expresan niveles más elevados de moléculas coestimuladoras (como CD80, CD86 o TACI) y más reducidos de moléculas inhibitoras de la respuesta B (como CD72 o CD305); además, tienen mayor afinidad por el Ag, puesto que ya han sufrido fenómenos de HMS.^{46,71-76} Esta activación rápida de linfocitos B de memoria es necesaria, ya que su función es generar una respuesta más eficiente durante la re-exposición frente a Ags conocidos. Desde el punto de vista fenotípico, se pueden distinguir porque la mayoría de los linfocitos B de memoria expresan CD27, y aproximadamente la mitad han sufrido un cambio de isotipo de su cadena pesada de Ig desde IgM/D a IgG (≈23%) o IgA (≈21%), y en menor medida también IgE (≈0,1% de todos los linfocitos B).^{38,77} El 50% restante de los linfocitos B de memoria retiene la expresión de los isotipos IgMD, pudiendo existir pequeñas poblaciones de células B de memoria que solo expresan IgD o IgM.³⁷ A pesar de que la mayoría de los linfocitos B de memoria expresan CD27⁺, también existe una población minoritaria de células B de memoria CD27⁻; esta gran heterogeneidad B, posiblemente refleja diversas funciones específicas del linfocito B de memoria frente a una gran variedad de patógenos con los que contacta.^{77,78}

Las CPs y los linfocitos B de memoria que expresan en su superficie IgG o IgA, pueden a su vez clasificarse en función de la subclase de isotipo que presentan.⁷⁹⁻⁸¹ Las subclases de

ambos isotipos de Ig muestran pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de inmunoglobulina, responsables de conferirles funciones efectoras diferentes. El isotipo IgG está formado por cuatro subclases, denominadas en orden de mayor a menor concentración en sangre: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Mientras que IgG1 e IgG3 son las únicas subclases de IgG capaces de activar de manera efectiva complemento y la citotoxicidad mediada por anticuerpos, IgG2 está especializada en la respuesta frente a Ag polisacáridicos.⁸²⁻⁸⁴ Aunque la función de la IgG4 todavía no se ha dilucidado completamente, se sospecha que pueda tratarse de una Ig reguladora, que evita la activación del sistema inmune frente a Ags recurrentes muy representados en el ambiente, especialmente alérgenos, y que por tanto lleva a una situación de tolerancia inmunológica.⁸⁰⁻⁸⁸ Por otro lado, el isotipo IgA está compuesto de dos subclases, IgA1 e IgA2, siendo la principal función de estas la protección en el MALT (presente por ejemplo, en el tracto respiratorio, urogenital y digestivo).^{89,90}

Las diferentes subclases de Ig se encuentran codificadas en segmentos génicos distribuidos en tres bloques a lo largo del gen *IGHC* en el cromosoma 14, situados a continuación de los segmentos génicos responsables de codificar la región variable de la cadena pesada de la Ig. Los isotipos IgM e IgD (*IGHC μ* e *IGHC δ* , respectivamente) son los que se encuentran más próximos a los segmentos génicos de la región variable, seguidos por IgG3, IgG1 e IgA1 (*IGHC γ 3*, *IGHC γ 1*, *IGHC α 1*, respectivamente), mientras que los segmentos constantes de IgG2, IgG4 e IgA2 (*IGHC γ 2*, *IGHC γ 4*, *IGHC α 2*) se encuentran localizados al final del gen. La expresión de una determinada subclase de Ig depende en parte, de factores solubles (i.e. citocinas) producidos fundamentalmente por los linfocitos T en respuesta a diferentes patógenos.⁹¹⁻⁹⁶ Recientemente, se ha descrito que tras sucesivos contactos con el Ag (específico), los linfocitos B de memoria sufren un cambio de isotipo en el que se seleccionan subclases de manera secuencial, siguiendo el orden en el que se encuentran distribuidas en el gen *IGHC* (demostrado al menos para las subclases de IgG).⁹⁷⁻¹⁰⁰

1.3. Principales vías de señalización de los linfocitos B

La activación de las vías de señalización asociadas al BCR son responsables (o están implicadas) en la mayor parte de los procesos biológicos fundamentales que ocurren en el linfocito B, como son su supervivencia, proliferación y maduración,¹⁰¹⁻¹⁰³ siendo asimismo

responsables del mantenimiento de la tolerancia inmunológica, y de la activación de las células B durante procesos infecciosos, mediante la identificación específica de Ags.¹⁰⁴ A lo largo de esta sección, describiremos tanto las vías de señalización mediados por BCR (y su regulación), como otras vías de señalización importantes para la activación del linfocito B.

1.3.1. Señalización a través del receptor de célula B (BCR)

En términos generales, la activación de vías de señalización a través de BCR puede ocurrir de dos formas: i) como consecuencia de una activación “tónica”, es decir, una señalización constante que no requiere presencia de Ag, o ii) como consecuencia de la interacción específica Ag-BCR.¹⁰⁵ Independientemente del modo en el que se produzca la activación B, se requiere la colocalización de varias moléculas de BCR. Debido a la corta porción intracitoplasmática de las moléculas de Ig, estas no pueden generar señales intracelulares; para ello, requieren de la presencia de los heterodímeros CD79a/CD79b.^{106,107}

Los mecanismos que conducen a la colocalización de moléculas de BCR durante la activación tónica no se conocen con precisión; por el contrario, se conocen mejor los elementos que favorecen la colocalización de estas moléculas tras la activación mediada por Ag. Por un lado, la colocalización se produce gracias a la presencia de complejos formados por una serie de proteínas asociadas al BCR, que de manera genérica se conocen como moléculas correceptoras (CD19, CD21, CD81 y CD225), y de las que merece destacar CD21, que actúa como receptor para proteínas del complemento (i.e. C3d), que normalmente se encuentran opsonizando patógenos. Se ha demostrado que la captación de Ag opsonizado mediada por CD21 reduce significativamente la concentración de Ag necesaria para la activación de la célula B. Otro mecanismo que favorece la colocalización del BCR y la activación del linfocito B, es la presencia de Ag polivalentes, es decir, aquellos que presentan múltiples repeticiones de un determinado epítipo, siendo capaces de interaccionar de manera simultánea con varias moléculas de BCR de una misma célula.

Los dímeros CD79a/CD79b están asociados con proteínas tirosina quinasa de la familia Src, como Lyn, Blk o Fyn, entre otras.¹⁰⁸ La colocalización de moléculas de BCR favorece la fosforilación, mediada por Lyn, de los dominios activadores de tipo ITAM (del inglés: “*immunoreceptor tyrosine-based activating motif*”) de CD79a/CD79b. La activación de estos

dominios ITAM provoca el reclutamiento de las moléculas Syk y ZAP-70, cuyas principales dianas son Btk, PLC γ 2, y una molécula adaptadora denominada Blnk. En su conjunto, estas moléculas forman un complejo denominado “señalosoma”, que permite el reclutamiento y activación de un mayor número de moléculas señalizadoras (e.g. Vav, Bam32, Lab, entre otras) (Figura 2).¹⁰⁹ Las diferentes moléculas presentes en este complejo proteico son responsables de profundos cambios en la célula, a través de la activación/inhibición de múltiples vías de señalización.¹⁰⁵ A modo de ejemplo, PLC γ 2 presente en el “señalosoma”, produce segundos mensajeros – diacilglicerol (DAG) e inositol-(1,4,5)-trisfosfato (IP $_3$)–, responsables de incrementar de forma notable la concentración de Ca $^{2+}$ intracelular, lo que conduce a la activación de la PKC, responsable a su vez de la translocación al núcleo de factores de transcripción como NFAT o NF- κ B, que finalmente modifican el perfil de expresión génica de la célula.^{110–114}

La activación del BCR es fundamental para la mayor parte de los procesos biológicos que ocurren en el linfocito B. Así, mientras que la señal tónica generada en ausencia de Ag se ha demostrado ser clave para la supervivencia del linfocito B,^{101,115} la activación del BCR genera diversos efectos biológicos, algunos aparentemente opuestos (e.g. supervivencia, apoptosis, proliferación, diferenciación). El efecto biológico final de la activación B mediada por BCR, dependerá del resultado global de señales positivas y/o negativas generadas por otras moléculas “accesorias” asociadas al BCR.

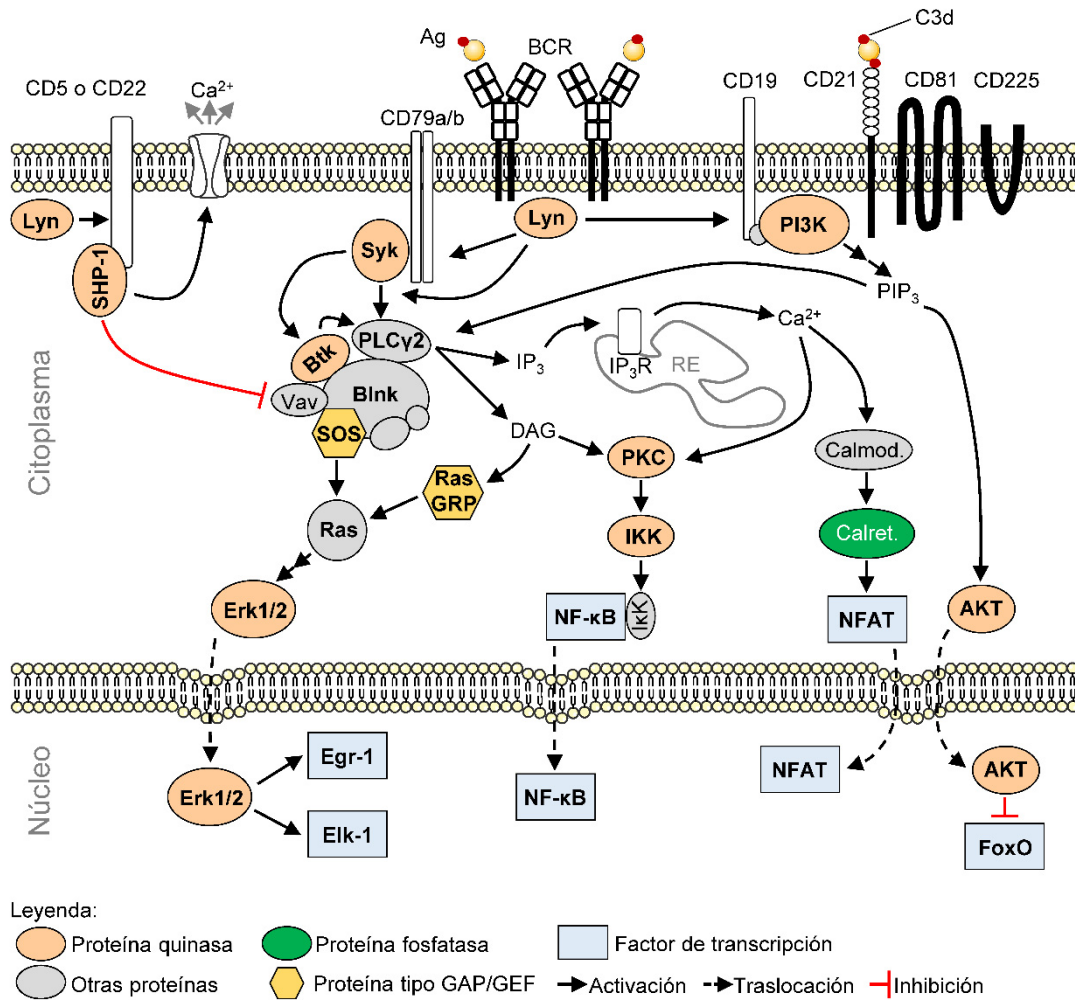
1.3.2. Activación a través del correceptor de BCR CD19-CD21-CD81-CD225

El correceptor de la célula B está formado por un conjunto de cuatro moléculas asociadas a BCR (CD19, CD21, CD81 y CD225), responsables de la modulación de la activación del linfocito B tras el contacto entre el Ag y el BCR.^{116,117}

La molécula **CD19** es una glicoproteína transmembrana expresada de manera exclusiva en células B a lo largo de prácticamente toda la diferenciación linfoide B, desde la célula pre-BI hasta la CP y el linfocito B de memoria.^{24,118,119} La activación de CD19 suele tener lugar como consecuencia del reconocimiento de Ag por parte del BCR. Durante este proceso, el BCR y CD79a/CD79b se colocan junto a las moléculas del correceptor, favoreciendo que las tirosina quinasas Lyn activen los dominios ITAM presentes, además de en CD79a/CD79b, en la región intracitoplasmática de CD19.^{119,120} Esto conduce al reclutamiento de PI3K (a través de la

subunidad p85) y de Vav, responsables de la activación de las vías de Akt y Erk, respectivamente (Figura 2).^{118,120-125}

Figura 2 | Representación esquemática de las vías de señalización mediadas por el BCR, el correceptor de BCR, y las moléculas inhibitoras del BCR CD5 y CD22.



Por tanto, CD19 activa las mismas vías de señalización que BCR, dando lugar a una amplificación de la señal de activación inducida por el propio BCR. A partir de estudios realizados en modelos animales y en familias con mutación en los genes CD19, CD21 y/o CD81, actualmente sabemos que la ausencia de CD19 (o de otras proteínas del correceptor) supone una disminución drástica en la activación de los linfocitos B tras el contacto antigénico, lo que tiene un impacto negativo en la respuesta inmunológica, especialmente notorio en respuestas secundarias tras nuevos contactos con el Ag.^{120,126,127}

Por otro lado, la molécula **CD21**, que forma parte también del correceptor de BCR, presenta una porción intracitoplasmática demasiado corta, que no le permite transducir señal alguna al interior celular. Por esta razón, se encuentra siempre asociada con moléculas CD19. CD21 actúa como receptor para moléculas C3d del complemento, las cuales suelen encontrarse adheridas a la superficie de patógenos, lo que conduce a la concentración de Ag en la superficie de la célula B, en la proximidad del BCR, promoviendo su activación y la señalización a través de CD19.

Las funciones específicas de **CD81** y **CD225** en el correceptor de BCR siguen siendo en gran medida desconocidas, aunque sí se sabe que ambas proteínas podrían participar en la amplificación de la señal de activación de las vías de señalización de BCR, siendo claves para la generación de una respuesta B eficiente.¹²⁸⁻¹³³

1.3.3. Moduladores negativos de la respuesta B

La activación del BCR y de CD19 genera una potente señal que conduce a profundos cambios en la célula B. Con el fin de evitar la sobreactivación de los linfocitos B, existen mecanismos que modulan la respuesta mediada por BCR, entre los que merece destacar los asociados a las proteínas CD5, CD22, y LAIR-1 (CD305).

CD5 es una proteína transmembrana que se expresa en prácticamente todas las células T, y en una pequeña proporción de las células B (e.g. linfocitos B inmaduros y una fracción de linfocitos B naive).^{134,135} Actualmente se sabe que esta molécula regula de manera negativa la activación a través de BCR.^{134,136} La fosforilación de un dominio específico de la región intracitoplasmática de CD5 conduce al reclutamiento de SHP-1, lo que supone la desfosforilación de componentes clave del “señalosoма”.¹³⁷ La expresión de CD5 en los linfocitos B parece ser importante para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, al menos en modelos animales.¹³⁸

CD22 es una glicoproteína expresada en linfocitos B, granulocito basófilo, mastocito y células dendríticas, que se une de forma específica a residuos de ácido siálico.¹³⁹⁻¹⁴¹ La porción intracitoplasmática de esta proteína contiene múltiples dominios inhibidores de tipo ITIM (del inglés: “*immunoreceptor tyrosine-based inhibiting motif*”), que son fosforilados tras la activación de BCR, por las mismas proteínas responsables de la activación de CD79a/CD79b y CD19 (i.e.

Lyn). Sin embargo, estos dominios reclutan la proteína SHP-1, una tirosina fosfatasa responsable de la desfosforilación (y por tanto inactivación), de muchos de los componentes del “señalosoma”.^{142,143} A su vez, la activación de CD22 favorece la expulsión de Ca^{2+} fuera de la célula, lo que en su conjunto conduce a una regulación negativa de la activación mediada por BCR (Figura 2).¹⁴⁴

Gracias a modelos animales, sabemos que la deficiencia de CD22 conduce a una activación exacerbada de las vías de señalización asociadas a BCR, y que supone un incremento notable de los niveles de Ca^{2+} intracelular, dando lugar a un fenotipo de célula B hiperactivada.^{140,145}

CD305 (LAIR-1) es una glicoproteína transmembrana que se expresa en la superficie de la mayoría de las células del sistema inmune.^{146–150} El reconocimiento de fibras de colágeno a través de su porción extracelular supone la activación de dos dominios ITIM intracelulares, responsables de reclutar las moléculas SHP-1 y SHP-2, junto con CsK, lo que en su conjunto merma la capacidad quinasa de los diferentes miembros de la familia Src.¹⁴⁸ A diferencia de CD5 o CD22, en modelos animales se ha descrito que la ausencia de LAIR-1 tan solo se refleja en cambios fenotípicos, sin llegar aparentemente a afectar a la capacidad de la respuesta inmunológica; estos hallazgos parecen indicar que la función reguladora de LAIR-1 podría ser suplida por las funciones de otras moléculas presentes en la célula.¹⁵¹

1.3.4. Otras vías de activación relevantes en linfocitos B

A pesar de que la activación a través de BCR es un evento fundamental en la activación del linfocito B, para generar una respuesta inmunológica plena y eficaz, es necesaria la activación de otras vías de señalización que complementan la activación a través de BCR. Entre otras, estas incluyen la señalización mediada por CD40-CD40L, por las proteínas Notch y por los receptores tipo *Toll*.

Señalización a través de CD40-CD40L. CD40 es una proteína transmembrana, expresada en la superficie de los linfocitos B y otras células presentadoras de antígeno,^{152,153} que tras contactar con su ligando específico CD40L (CD154, presente en la superficie de los linfocitos T activados), es capaz de generar una potente señal activadora.¹⁵⁴ Esta unión CD40-CD40L ocurre habitualmente tras el reconocimiento específico por parte de los linfocitos T, de

Ags presentados por los linfocitos B. Actualmente, sabemos que la activación de CD40 es un evento fundamental para la generación y mantenimiento del CG, así como para que se produzca la HMS y el CI.^{155,156} Desde el punto de vista molecular, el contacto de CD40L con CD40 conlleva el reclutamiento hacia las porciones intracitoplasmáticas de CD40, por un lado, de moléculas TRAF (del inglés: *TNFR-associated factors*) responsables de la translocación al núcleo de NF- κ B, y por otra parte, de Jak3, con la consiguiente activación de STAT5.¹⁵⁷

Señalización a través de Notch. La señalización a través de Notch es responsable de la regulación de una gran cantidad de procesos, tanto durante el desarrollo embrionario, como posteriormente en la diferenciación, supervivencia y proliferación celular.^{158,159} A pesar de que Notch-1 se expresa en todas las células B maduras, se desconoce qué función desarrolla en las mismas.¹⁶⁰ Durante la hematopoyesis, Notch-1 regula la diferenciación hacia la línea linfocitoide T, bloqueando la diferenciación linfocitoide B.^{159,161} No obstante, en modelos murinos se ha demostrado que Notch es esencial para la producción de células B de la zona marginal de los OLS, y la presencia de mutaciones en Notch se ha relacionado tanto con neoplasias de linfocitos T como B.^{159,162–164}

Señalización a través de receptores tipo Toll. Los receptores tipo *Toll* (TLR, del inglés: “*Toll-like receptors*”) son un conjunto de moléculas que participan en la activación de la respuesta inmune innata.¹⁶⁵ Estas proteínas son capaces de identificar patrones moleculares específicos de patógenos denominados PAMPs (del inglés: “*pathogen associated molecular patterns*”), muy conservados durante la evolución. Muchas de estas moléculas se hallan expresadas en linfocitos B –fundamentalmente TLR1, 6, 7, 9 y 10–,¹⁶⁶ y su activación lleva a la translocación nuclear de NF- κ B, a través del reclutamiento de la molécula activadora MYD88 y/o de Syk, que a su vez conduce a una sinergia con la activación mediada a través de BCR y su correceptor.^{167–169}

Recientemente, se ha propuesto que para la activación plena del linfocito B se requieren tres señales: i) activación del BCR mediante contacto con el Ag, ii) la estimulación a través de CD40-CD40L (i.e. interacción con el linfocito T) y iii) la señal proporcionada por los TLRs.¹⁷⁰

2. LINFOCITOSIS B MONOCLONAL (LBM)

2.1. Definición de LBM

La linfocitosis B monoclonal (LBM) se define por la presencia en SP de pequeñas poblaciones de linfocitos B con características monoclonales (en número inferior a 5×10^9 células B clonales/ μL), de aspecto maduro y con un fenotipo aberrante (es decir, diferente al de las poblaciones de linfocitos B normales circulantes) en individuos aparentemente sanos, en ausencia de signos o síntomas de síndrome linfoproliferativo crónico de células B (SLPC-B).

La LBM es una entidad muy frecuente en la población general adulta, en la que los linfocitos B clonales identificados presentan patrones fenotípicos similares a los de las células B tumorales de diversos SLPC-B, siendo particularmente frecuente en nuestro entorno que muestren un fenotipo característico de la leucemia linfática crónica B (LLC). Hasta la fecha, no se conocen los factores ontogénicos involucrados en la aparición y expansión de estos clones de linfocitos B circulantes, ni se ha aclarado el significado biológico y clínico de su presencia en la SP de sujetos sanos, o su verdadera relación con el desarrollo/progresión a un SLPC-B clínicamente manifiesto.¹⁷¹⁻¹⁷⁵

2.2. Identificación de linfocitos B clonales en sangre periférica de sujetos con LBM

La citometría de flujo es la técnica de elección para el diagnóstico de LBM. Desde finales de los años 90, la disponibilidad de técnicas de citometría de flujo multiparamétrica progresivamente más sensibles, permitió detectar en la SP de sujetos sanos la presencia de células B maduras con características (mono)clonales (es decir, con restricción en la expresión de las cadenas ligeras de las Ig κ o λ , o bien una ratio $\kappa:\lambda >3:1$ o $<0,3:1$ ^{171,176}), fenotípicamente aberrantes. La presencia de ambos criterios demostrados por citometría de flujo (restricción de cadena ligera de las Ig y fenotipo aberrante), se considera evidencia suficiente para definir la existencia de clonalidad B.^{171,176} No obstante, en ocasiones las células B clonales incluyen más de un clon de linfocitos B, situación a la que suele referirse como LBM multiclonal (vs. LBM monoclonal). En el momento actual, es posible detectar linfocitos B clonales en SP en niveles muy por debajo de las 100 células/ μL , mediante el empleo de paneles de anticuerpos que permiten identificar de forma específica las células clonales/aberrantes, tras analizar un número elevado de leucocitos de SP (por ejemplo $>5 \times 10^6$) para aumentar la sensibilidad de detección.¹⁷⁷

2.3. Criterios diagnósticos de LBM

En el año 2005, el Consorcio Internacional de LLC Familiar (*International Familial CLL Consortium*) estableció por primera vez criterios bien definidos para el diagnóstico de LBM;¹⁷¹ posteriormente, a partir del año 2008, la LBM pasó a ser considerada una entidad diagnóstica por la Organización Mundial de la Salud (OMS), englobada dentro de la categoría de las neoplasias de células linfoides B maduras.¹⁷⁸ El diagnóstico de LBM implica la identificación, en individuos aparentemente sanos (sin evidencia clínica de SLPC-B), de al menos una población de linfocitos B clonales con fenotipo aberrante, persistente en el tiempo (≥ 3 meses) y en número inferior a 5×10^9 células/L.^{171,178,179}

2.4. Clasificación de la LBM

Desde su identificación, se han establecido distintos subtipos de LBM, en función i) del número absoluto de linfocitos B clonales circulantes, ii) de su perfil fenotípico, y iii) de la presencia de uno o más clones de células B aberrantes circulantes.

2.4.1. Clasificación de la LBM según el número absoluto de linfocitos B clonales

A partir del año 2017, la OMS estableció los criterios para la subclasificación de la LBM en dos grandes grupos, en función del número de linfocitos B clonales presentes en SP: a) LBM de “bajo recuento” (LBM^{lo}), cuando el número de células B clonales es inferior a $0,5 \times 10^9$ /L; y b) LBM de “alto recuento” (LBM^{hi}), cuando este número oscila entre $0,5 \times 10^9$ y $< 5 \times 10^9$ /L.^{179,180} La LBM^{lo} suele detectarse en análisis realizados sobre sujetos de la población general con un recuento normal de linfocitos, habiéndose referido en algunos estudios medianas de 1 célula clonal/ μ L.¹⁸¹ Por el contrario, la identificación de individuos con LBM^{hi} suele hacerse habitualmente entre sujetos que presentan una linfocitosis absoluta en una analítica de rutina ($> 3,5 \times 10^9$ linfocitos totales/L en SP), con una mediana de aproximadamente 3.000 células clonales/ μ L.^{174,181}

2.4.2. Clasificación fenotípica de la LBM

Además de la clasificación anterior basada en el número absoluto de linfocitos B clonales circulantes, la LBM también puede subclasificarse en tres tipos diferentes, de acuerdo con el perfil fenotípico de los linfocitos B aberrantes: LBM tipo LLC típica, LBM tipo LLC atípica y LBM con fenotipo no-LLC.¹⁸⁰

La **LBM de tipo LLC típica**, constituye en nuestro entorno, aproximadamente el 80% de todas las LBM. Las células B clonales presentan un patrón inmunofenotípico idéntico al de la LLC (detallado más adelante en el Capítulo 3 de esta memoria), caracterizado por una expresión fuerte de las moléculas de membrana CD19, CD23 y CD5, junto con positividad para CD200 y CD27, asociada a una expresión débil de marcadores relacionados con el BCR, como CD79b^{lo}, IgMD^{lo} e Igkappa^{lo} o Iglambda^{lo}, y CD20^{lo}.^{171,179,182,183} No se han encontrado diferencias significativas en el patrón fenotípico que muestran las células B clonales entre la LBM de tipo LLC y la leucemia linfática crónica para ninguna de estas (y otras) proteínas analizadas,^{182,183} con la excepción de algunos marcadores utilizados como indicadores pronóstico en la LLC, así como moléculas implicadas en tráfico celular (*homing*), tal como se describe más adelante en esta introducción.^{183,184}

A su vez, la **LBM con fenotipo de LLC atípica** se caracteriza por un patrón inmunofenotípico similar al de la LLC, sin llegar a cumplir todos los criterios de la misma. En este grupo se incluyen frecuentemente los casos que presentan una coexpresión fuerte de CD5 y CD20 y/o inmunoglobulina de superficie (slg) y/o que muestran ausencia de CD23, fenotipo característico del linfoma de células del manto (LCM),¹⁷⁸ además de otros casos que muestran un fenotipo en el que en general las células B clonales expresan CD5 en ausencia de otras características fenotípicas típicas de LLC.

Finalmente, la **LBM de fenotipo no-LLC** constituye un subgrupo fenotípico minoritario de LBM que incluye casos en los que las células B clonales presentan un fenotipo diferente del de la LLC típica o atípica, con células CD5⁻, motivo por el que este grupo también se denomina “LBM CD5⁻”. Los fenotipos más frecuentemente encontrados en este tipo de LBM se asemejan a los de las células tumorales del linfoma B de la zona marginal (LZM), tricoleucemia (TL), o bien pueden no asociarse a ninguna categoría fenotípica específica (“inclasificables”). Actualmente

se dispone de información limitada y con frecuencia contradictoria, con respecto a la naturaleza biológica y significado clínico de la LBM de fenotipo no-LLC.^{178,185-189}

2.4.3. Clasificación de la LBM en función del número de clones B detectados

Dependiendo de la presencia de un único clon de células B o de más de un clon de células B circulantes, podemos subclasificar la LBM en monoclonal y multiclonal, debiendo en este último caso subclasificarse cada uno de los clones B de acuerdo con su fenotipo y número.

2.5. Prevalencia de la LBM

Aunque la LBM presenta en general una elevada prevalencia, esta puede variar de forma importante en función de la población analizada.

2.5.1. Prevalencia de LBM en población adulta sana

La primera referencia bibliográfica acerca de la prevalencia de la LBM en individuos sanos (sin signos ni síntomas de SLPC-B) de la población general corresponde al momento de su descubrimiento. Así, en el año 1997 el grupo del Dr. Gerald Marti emitió un informe para el Servicio de Salud Pública de los EEUU, mostrando que durante el transcurso de un estudio epidemiológico se habían identificado 11 adultos sanos con poblaciones de linfocitos B clonales en su SP.^{190,191} A partir de ese momento, han sido muchos los estudios que han tratado de determinar la frecuencia de la LBM, tanto en la población general, como en familiares de pacientes con LLC.^{176,177,188,192-204} La proporción de casos afectados varía enormemente, desde <1% hasta 18%, dependiendo fundamentalmente de tres factores: i) la población de estudio (e.g. población general, familiares de pacientes con LLC familiar, área geográfica o etnia analizada); ii) la edad, así como el sexo de los individuos estudiados; y iii) la sensibilidad analítica de la técnica aplicada. En la Tabla 1 se resumen los principales hallazgos de los estudios más relevantes publicados hasta la fecha, orientados a determinar la prevalencia de LBM, tanto en la población general, como en familiares de primer grado de pacientes con LLC. La frecuencia de casos identificados varía extraordinariamente entre los diferentes grupos de estudio, incluso cuando las características de las poblaciones estudiadas son aparentemente muy similares; esto se debe a la ausencia de estandarización en los métodos de citometría de flujo utilizados, de

forma que la sensibilidad de la técnica empleada ha sido muy variable entre los diversos estudios (Tabla 1). Así, en los primeros trabajos realizados, en los que se aplicó citometría de flujo de 2-4 colores analizando menos de 500.000 células/muestra, la prevalencia de LBM en la población general oscilaba entre 0,3% y 6,4%.^{176,195,196}

Tabla 1 | Prevalencia de LBM en la población general y en familiares de pacientes con LLC familiar en diferentes áreas geográficas/grupos étnicos.

Prevalencia de LBM en la población general			
Estudio	Características de la población de estudio	Sensibilidad de la técnica empleada	Prevalencia de LBM
Sarasua y Marti et al. (1997) ¹⁹¹ Informe para la USPHS	Voluntarios residentes en áreas próximas vs. lejanas a zonas de residuos tóxicos. EEUU Edad: 40-76 años. N. de Individuos estudiados: 1.926	Citometría de 2 colores . N. de células analizadas: 20.000	Total: 11/1.926 (0,57%)
Rawstron et al. (2002) ¹⁷⁶	Pacientes ambulatorios con hemograma normal y ausencia de enfermedad hematológica u oncológica. Reino Unido Edad: >40 años. N. de Individuos estudiados: 910	Citometría de 4 colores . N. de células analizadas: $\geq 2 \times 10^5$	Total: 41/910 (4,5%) Tipo LLC: 32/910 (3,5%) 40-49 años: 1,9% 50-59 años: 2,4% 60-69 años: 3,2% 70-79 años: 7,7% 80-89 años: 4,5% Ratio Hombre:Mujer; 2,1 Tipo no-LLC: 9/910 (1%)
Ghia et al. (2004) ¹⁹⁵	Pacientes ambulatorios (hemograma normal). Italia Edad: >65 años. N. de Individuos estudiados: 500	Citometría de 4 colores . N. de células analizadas: $\geq 2 \times 10^5$	Total: 32/500 (6,4%) Tipo LLC: 22/500 (4,4%) 65-74 años: 3,4% ≥ 75 años: 5,7% Ratio Hombre:Mujer; 1 Tipo no-LLC: 7/500 (1,4%)
Rachel et al. (2007) ¹⁹⁶	Donantes de sangre. EEUU Edad: >17 años. N. de Individuos estudiados: 5.141	Citometría de 2 colores . N. de células analizadas: 20 μ L SP (estimadas 140.000 células)	Total: 6/5.141 (0,12%) Tipo LLC: 6/5.141 (0,12%) <65 años: 0,04% ≥ 65 años: 0,08% Ratio Hombre:Mujer; 2 Tipo no-LLC: NE.
Nieto et al. (2009) ¹⁷⁷	Población general sana reclutada a partir del Sistema de Atención Primaria de Salud de Salamanca (hemograma normal y ausencia de enfermedad hematológica) España Edad: >40 años. N. de Individuos estudiados: 608	Citometría de 8 colores . N. de células analizadas: $\geq 5 \times 10^6$	Total: 73/608 (12%) Tipo LLC: 73/608 (12%) 40-49 años: 5,1% 50-59 años: 5,3% 60-69 años: 18% 70-79 años: 22% 80-89 años: 27% ≥ 90 años: 75% Ratio Hombre:Mujer; 1,3 Tipo no-LLC: NE

Prevalencia de LBM en la población general (continuación de la tabla)

Estudio	Características de la población de estudio	Sensibilidad de la técnica empleada	Prevalencia de la LBM
Dagklis et al. (2009) ¹⁹⁷	Donantes sanos (hemograma normal). Italia Edad: 18-102 años. N. de Individuos estudiados: 1.725	Citometría de 5 colores . N. de células analizadas: $\geq 5 \times 10^5$	Total: 128/1.725 (7,4%) Tipo LLC: 89/1.725 (5,2%) <40 años: 0,2% 40-49 años: 1,7% 50-59 años: 4,7% 60-69 años: 8,7% 70-79 años: 9,1% ≥ 80 años: 9,3% Ratio Hombre:Mujer; 1,7 Tipo no-LLC: 39/1.725 (2,3%)
Nieto et al. (2010) ¹⁸⁸	Población general sana reclutada a partir del Sistema de Atención Primaria de Salud de Salamanca (hemograma normal, ausencia de enfermedad hematológica) España Edad: >40 años. N. de Individuos estudiados: 639	Citometría de 8 colores . N. de células analizadas: $\geq 5 \times 10^6$	Total: 95/639 (15%) Tipo LLC: 82/639 (13%) Tipo no-LLC: 13/639 (2%)
Shim et al. (2014) ²⁰⁰	Donantes de sangre. EEUU Edad: ≥ 45 años. N. de Individuos estudiados: 2.098	Citometría de 6 colores . N. de células analizadas: $\geq 5 \times 10^5$	Total: 149/2.098 (7,1%) Tipo LLC: 101/2.098 (4,8%) Ratio Hombre:Mujer; 1,4 Tipo no-LLC: 21/2.098 (1%)
Aljurf et al. (2016) ²⁰¹	Donantes sanos. Emiratos Árabes Edad: >50 años. N. de Individuos estudiados: 365	Citometría de 8 colores . N. de células analizadas: $\approx 1 \times 10^6$	Total: 21/365 (5,8%) Tipo LLC: 10/365 (2,7%) Tipo no-LLC: 11/365 (3%)
Rawstron et al. (2017) ²⁰⁴	Donantes sanos de dos poblaciones diferentes. Uganda y Reino Unido Edad: ≥ 45 años. N. de Individuos estudiados: 302 en Uganda 302 en Reino Unido	Citometría de 8 colores . N. de células analizadas: $\geq 5 \times 10^5$	Total: 42/302 (14%) en Uganda. 25/302 (8%) en Reino Unido. Tipo LLC: 3/302 (1%) en Uganda. 21/302 (7%) en Reino Unido. Tipo no-LLC: 41/302 (14%) en Uganda. 6/302 (2%) en Reino Unido.
Prevalencia de LBM en familiares de primer grado de pacientes con LLC			
Rawstron et al. (2002) ¹⁹³	Familiares de primer grado de pacientes con LLC familiar. Reino Unido. Edad: 23-86 años. N. de Individuos estudiados: 59.	Citometría de 4 colores . N. de células analizadas: $\geq 2 \times 10^5$	Total: 8/59 (14%) Tipo LLC: 7/59 (12%) Ratio Hombre:Mujer; 1,3 Tipo no-LLC: 1/59 (1,7%)

Prevalencia de LBM en familiares de primer grado de pacientes con LLC (continuación de la tabla)

Estudio	Características de la población de estudio	Sensibilidad de la técnica empleada	Prevalencia de la LBM
Marti et al. (2003) ¹⁹⁴	Familiares de primer grado de pacientes con LLC familiar. EEUU Edad: NI. N. de Individuos estudiados: 33	Citometría de 3 colores . N. de células analizadas: NI.	Total: 6/33 (18%) Ratio Hombre:Mujer; 0,5
Matos et al. (2009) ¹⁹⁸	Familiares de primer grado de pacientes con LLC esporádica. Brasil Edad: 18-84 años. N. de Individuos estudiados: 167	Citometría de 4 colores . N. de células analizadas: 3x10 ⁵	Total: 7/167 (4,1%) Tipo LLC: 6/167 (3,6%) LLC atípica: 1/167 (0,6%) <40 años: 0% 40-60 años: 2,5% >60 años: 16% Ratio Hombre:Mujer; 2,5
Goldin et al. (2010) ¹⁹⁹	Familiares de primer grado de pacientes con LLC familiar. EEUU Edad: NI. N. de Individuos estudiados: 505	Citometría de 6 colores . N. de células analizadas: 1-5x10 ⁵	Total: 86/505 (17%) <40 años: 5,6% 40-49 años: 12% 50-59 años: 17% 60-69 años: 18% 70-79 años: 26% 80-89 años: 31% ≥90 años: 50% Ratio Hombre:Mujer; 1,3 Tipo LLC: 74/505 (15%) Tipo no-LLC: 12/505 (2,4%)
Bajuk et al. (2016) ²⁰³	Dos grupos: i) familiares de pacientes con LLC esporádica y ii) donantes sanos de la población general. Eslovenia Edad: 23-88 años N. de Individuos estudiados: i) 54 ii) 162	Citometría de 5 colores . N. de células analizadas: ≥1x10 ⁶	i)Total: 3/54 (5,6%) Tipo LLC: 0/54 (0%) Tipo no-LLC: 3/54 (5,6%) ii)Total: 7/162 (4,3%) Tipo LLC: 2/162 (1,2%) Tipo no-LLC: 5/162 (3,1%)
Demirci et al. (2017) ²⁰²	Familiares de primer grado de pacientes con LLC esporádica. Turquia Edad: 18-77 años. N. de Individuos estudiados: 136	Citometría de 4 colores . N. de células analizadas: 2x10 ⁵	Total: 17/136 (12,5%) <40 años: 13% 40-60 años: 12% >60 años: 40% Ratio Hombre:Mujer; 1,4

LBM: linfocitosis B monoclonal; **LLC:** leucemia linfática crónica; **N.:** número; **NI:** no indicado.

Posteriormente, el uso de técnicas de citometría de flujo de alta sensibilidad, basada en el empleo de paneles de anticuerpos monoclonales en combinaciones de ≥8 colores y análisis de ≥1 millón de células, permitió detectar frecuencias de LBM de entre el 7% y el 14% de los individuos sanos de la población general.^{177,188,197,200} El estudio publicado con mayor sensibilidad hasta la fecha es el de Nieto et al., en el que se detectó una prevalencia de LBM del 15% en individuos sanos de la población general mayores de 40 años, llegando a alcanzar el 25% en sujetos mayores de 80 años.^{177,188} Un modelo matemático desarrollado por este mismo grupo concluyó que, si fuésemos capaces de analizar 50 mL de SP, la frecuencia de LBM en sujetos

mayores de 70 años ascendería a prácticamente el 100% de los casos.²⁰⁵ La veracidad del modelo matemático se verificó en este mismo estudio, realizando el análisis de LBM a partir de 50 mL de SP en 9 donantes sanos >70 años, en los que no se habían detectado clones LBM en 1 mL de sangre, y en los que pudo confirmarse la presencia de linfocitos B clonales de tipo-LLC en 8 de los 9 casos analizados.²⁰⁵ En líneas generales, la práctica totalidad de los estudios concluyen que la frecuencia de LBM en la población general aumenta drásticamente con la edad y afecta a una mayor proporción de hombres que de mujeres, independientemente del fenotipo de las poblaciones B clonales y la sensibilidad del método de detección empleado.

Como hemos referido previamente, la mayoría de los casos de LBM identificados en la población general en nuestro entorno, presentan un fenotipo de tipo LLC ($\approx 80\%$), frente al $\approx 20\%$ de casos con fenotipo no-LLC,^{172,192} si bien este predominio tan mayoritario de la LBM de fenotipo similar a la LLC ocurre preferentemente en países europeos (Reino Unido, Italia, España) y Estados Unidos (Tabla 1). Frente a esta distribución típica de los países occidentales, estudios preliminares realizados tanto en poblaciones árabes como africanas, muestran un predominio de la LBM de tipo no-LLC. Así, en un estudio llevado a cabo en los Emiratos Árabes Unidos, la prevalencia de LBM en individuos mayores de 50 años fue de 5,8%, un porcentaje muy similar al previamente descrito en países occidentales (considerando la sensibilidad técnica aplicada), pero sorprendentemente, el 52% de los casos de LBM correspondían a fenotipos de LBM no-LLC, una frecuencia casi 3 veces superior a la referida en países occidentales.²⁰¹ De manera similar, en individuos de una población africana (Uganda) mayor de 45 años se encontró una frecuencia de LBM del 14%, de los que el 97% de los casos mostraban un fenotipo no-LLC.²⁰⁴ Aunque no existen referencias de estudios que indiquen la frecuencia de LBM en poblaciones asiáticas, sabemos que la LLC es mucho menos prevalente en estas poblaciones.²⁰⁶⁻²¹² Hasta la fecha, el único estudio cuyo objetivo ha sido determinar la frecuencia de LBM en población asiática, se ha llevado a cabo en individuos de ascendencia japonesa (sin mezcla racial) que viven en un medio ambiente occidental (São Paulo, Brasil), habiéndose observado una prevalencia de LBM de cerca del 8%, una frecuencia muy similar a la ya descrita para poblaciones occidentales.²¹³

2.5.2. Prevalencia de LBM en pacientes no hematológicos con linfocitosis

Hoy sabemos que es relativamente frecuente identificar clones linfoides B en SP (entre $0,5$ y $<5 \times 10^9/L$) de individuos que presentan linfocitosis ($>3,5 \times 10^9/L$), en ausencia de procesos infecciosos o cualquier otra sintomatología clínica sugerente de SLPC-B. En estos casos, la prevalencia de LBM es más elevada que la observada en la población general. De Tute et al. demostraron que incluso con técnicas de citometría de baja resolución (4 colores), la prevalencia de LBM en individuos con linfocitosis absoluta es del 14%, casi el doble que la esperada para individuos de la población general cuando se emplean técnicas de citometría de sensibilidad similar.²¹⁴

2.5.3. Prevalencia de LBM en familiares de pacientes diagnosticados de LLC

Dado que la práctica totalidad de los casos de LBM en occidente presentan un fenotipo indistinguible del de la LLC, intentar establecer una relación entre ambas entidades ha sido uno de los principales objetivos de los grupos interesados en su estudio. Por esta razón, algunos estudios se han centrado en determinar la prevalencia de LBM en familiares sanos de primer grado (consanguíneos) de pacientes con LLC. Para un análisis adecuado de los resultados de estos trabajos, tenemos que distinguir en primer lugar, entre aquellos estudios centrados en el análisis de los familiares de pacientes con LLC esporádica y los que analizaron familiares de pacientes con LLC familiar. La diferencia radica en que la LLC esporádica se diagnostica en individuos que no tienen ningún familiar directo afectado, mientras que para considerar una LLC familiar debe haber al menos dos casos de familiares de primer grado afectados por la enfermedad.²¹⁵⁻²¹⁸ Dependiendo de a qué situación nos refiramos, la prevalencia de LBM es diferente. Así, mientras que entre los familiares de pacientes con LLC esporádica se observan frecuencias de LBM similares a las de la población general, en los familiares de pacientes con LLC familiar la prevalencia de LBM encontrada es muy superior, oscilando entre 14% y 18% de los mismos, porcentajes significativamente más elevados que los observados en la población general con técnicas de sensibilidad similar (Tabla 1). Este incremento es especialmente llamativo en familiares menores de 40 años respecto a la población general de la misma edad (5,4% vs. 0,2%, respectivamente).^{198,202,203,219} Sin embargo, estas diferencias en la prevalencia de LBM entre familiares sanos de pacientes con LLC familiar y otros sujetos sanos de la

población general sin antecedentes familiares de LLC se van diluyendo al avanzar la edad.^{176,195,196}

Por lo tanto, la LBM es una entidad muy prevalente en la población general (>100 veces la frecuencia de la LLC), cuya frecuencia aumenta con la edad. Claramente existe un componente genético que relaciona la LBM con la LLC, al ser la primera mucho más frecuente entre familiares de pacientes con LLC familiar. Por otro lado, la frecuencia de casos de LBM encontrados en el estudio de sujetos asiáticos que residen en un ambiente occidental antes referido, es muy similar a la observada en poblaciones caucásicas, lo cual abre la puerta a pensar que existirían además factores del (micro)medioambiente (por ejemplo, agentes infecciosos, contaminantes ambientales y/o la dieta) que puedan estar relacionados con el desarrollo y aparición de esta enfermedad leucémica.²¹³

CAPÍTULO 3. LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B (LLC)

3.1. Definición

La LLC es el tipo de leucemia más frecuente en la población adulta en países occidentales, con una incidencia de 4-6 casos nuevos por cada 100.000 habitantes y año.²²⁰⁻²²² Esta neoplasia se caracteriza por la acumulación en SP y MO de linfocitos B clonales, morfológicamente maduros y con un inmunofenotipo aberrante muy característico (CD19⁺ CD5⁺ CD23⁺ CD20^{lo} CD79b^{lo} CD200⁺ sIgMD^{lo} y sIgkappa^{lo} ó sIglambda^{lo}), siendo frecuente también la infiltración por las células tumorales de OLS como los ganglios linfáticos (GL) y/o el bazo.²²³⁻²²⁶ Desde el punto de vista clínico, se trata de una enfermedad hasta la fecha incurable (exceptuando los pocos casos en los que los pacientes reciben trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos) que se caracteriza por una gran heterogeneidad en cuanto a sus manifestaciones clínicas, evolución y pronóstico, en gran parte debidas a la heterogeneidad biológica subyacente.^{220,221,227} A pesar de ser una de las leucemias más estudiadas en nuestro medio, y de los avances alcanzados en los últimos años en nuestro conocimiento de la enfermedad, hasta la fecha no se ha establecido de forma definitiva cuál es su contrapartida celular normal, así como los principales eventos oncogénicos que conducen a su aparición y a la progresión maligna.²²⁸

3.2. Criterios diagnósticos

Actualmente, para el diagnóstico de la LLC, la OMS ha adoptado los criterios diagnósticos propuestos en el año 2008 por el “*International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*” y que requieren de la identificación de $\geq 5 \times 10^9/L$ linfocitos B clonales en SP, en los que se ha de demostrar la coexpresión de CD5 y CD23, junto con una expresión débil de CD20 y de los marcadores asociados a BCR: CD79b^{lo}, sIgMD^{lo} ó sIgM^{lo}, sIgκ^{lo} ó sIgλ^{lo}.^{178,229} En ocasiones, las células B clonales con el fenotipo anteriormente descrito, pueden localizarse principalmente en OLS, en lugar de acumularse en la SP y MO, condicionando un cuadro clínico caracterizado por la presencia de adenopatías. Si este es el caso, y el número de linfocitos B clonales en SP es inferior a las $5 \times 10^9/L$ células circulantes necesario para el diagnóstico de LLC, estaríamos hablando de una entidad conocida como linfoma linfocítico de célula pequeña (LLCP), considerada la contrapartida linfomatosa de la LLC, y englobado por la OMS en la misma categoría diagnóstica (LLC/LLCP).^{178,220,221,229,230}

3.3. Incidencia y prevalencia

Como hemos referido anteriormente, la LLC es la leucemia más frecuente en países occidentales. Se estima que en el año 2018, solo en los EEUU se producirán aproximadamente 21.000 nuevos diagnósticos y 4.500 fallecimientos a causa de la enfermedad.²³¹ Sin embargo, la incidencia de la LLC varía notablemente en función de varios factores, entre los que cabe destacar la edad, el sexo y la raza. Así, aunque la edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico de la enfermedad se encuentra entre los 70 y 72 años (70% de los pacientes tienen más de 65 años al diagnóstico), lo que indica que se trata de una neoplasia característica de personas de edad avanzada, la enfermedad puede manifestarse en personas menores de 50 años de edad.^{220,232,233} Además, se ha observado una prevalencia de 1,5 a 2 veces superior en hombres que en mujeres.²³⁴ Los últimos datos del “*National Cancer Institute*” muestran una tendencia ascendente en la incidencia de LLC, situación que posiblemente sea debida en gran parte al incremento del número de revisiones médicas y la mejora de los métodos diagnósticos. En paralelo al aumento de la incidencia de la LLC, se observa una tendencia a la reducción en el número de fallecimientos esperados a causa de la enfermedad, directamente relacionada con las mejoras en el manejo terapéutico de los pacientes y el acceso, en los últimos años, a nuevos

tratamientos asociados a la quimioterapia, como la inmunoterapia y el empleo de inhibidores de las vías de transducción de señal a través de BCR o de Bcl-2.^{231,235-243}

Por otro lado, numerosos estudios han determinado que la frecuencia de LLC es claramente inferior en poblaciones asiáticas respecto a las poblaciones occidentales, incluso en individuos de origen asiático que habitan en un ambiente occidental, a diferencia de lo descrito en estudios preliminares para la LBM.^{206,208,209,213,244-246} Estos hallazgos, junto con la mayor frecuencia de LLC (entre 2 y 8 veces superior) en familiares de pacientes con esta misma enfermedad, sugiere la existencia de un componente genético (hereditario) en su aparición.²⁴⁷ De acuerdo con ello, estudios recientes de variabilidad genómica basada en SNPs, realizados en paralelo en donantes sanos y pacientes diagnosticados de LLC, han permitido identificar determinadas variantes alélicas asociadas a un mayor riesgo ($\approx 1,5$ veces mayor) a padecer esta leucemia, entre las que merece destacar las variantes rs9378805 (6q25.3) y rs735665 (11q24.1), identificadas en varios estudios independientes, llevados a cabo sobre diferentes cohortes de pacientes.²⁴⁸⁻²⁵⁸ La presencia de estos SNPs podría contribuir a explicar, al menos en parte, la mayor frecuencia de LLC y LBM en familiares de pacientes que padecen la enfermedad, y posiblemente también, la menor prevalencia de LLC en poblaciones asiáticas respecto a las poblaciones occidentales.²⁵⁹

3.4. Características clínicas

La LLC se caracteriza por una gran heterogeneidad clínica, tanto en su forma de presentación, como en su evolución y pronóstico, lo cual complica su manejo terapéutico. La heterogeneidad clínica de la LLC se traduce en que un tercio de los pacientes nunca va a necesitar tratamiento, mientras que una proporción similar de casos lo requerirán desde el momento del diagnóstico. Muchos pacientes con LLC no presentan síntomas al inicio de la enfermedad, ya que frecuentemente (dos terceras partes de los casos) el diagnóstico se realiza por causas ajenas a la neoplasia, generalmente por el hallazgo casual de una linfocitosis en un análisis de sangre de rutina. Una pequeña proporción de pacientes refiere síntomas B al diagnóstico, incluyendo pérdida involuntaria de peso ($>10\%$ en un periodo de 6 meses), sudoración nocturna y/o fiebre en ausencia de infección. En los estadios más avanzados, además de presentar más frecuentemente síntomas B, los pacientes con LLC pueden tener

hepatomegalia (14-25%),^{223,225,226} esplenomegalia (50-60%),^{225,226,260} y/o adenopatías (80-90%)^{225,226,260} debido a la acumulación de células B clonales en dichos órganos; en estos estadios son también frecuentes la anemia (5-20%)²⁶¹⁻²⁶⁴ y la trombopenia (6-10%) como consecuencia de la infiltración de la MO^{220,221,265,266} y/o, en menor medida, por la aparición de fenómenos autoinmunes.

En este sentido, cabe señalar que en la LLC el sistema inmune se encuentra afectado a múltiples niveles. En primer lugar, es frecuente la presencia de enfermedades autoinmunes, entre las que merece destacar la anemia hemolítica autoinmune (AHA) y la trombopenia autoinmune (TAI), que constituyen más del 25% de las citopenias presentes en estos pacientes.^{220,221,263,265-272} En segundo lugar, las infecciones suponen una de las principales causas de morbi-mortalidad en la LLC. De hecho, con anterioridad a la existencia de contadores hematológicos automatizados, la principal causa de diagnóstico de LLC eran los frecuentes procesos infecciosos agudos que padecían estos pacientes,^{273,274} y que afectan fundamentalmente a las vías respiratorias y, en menor medida, al tracto urinario.²⁷⁵⁻²⁷⁷ Los principales agentes etiológicos responsables de estos procesos infecciosos son bacterias (67%), especialmente bacterias encapsuladas como *S.pneumoniae*, *H.influenzae* o *S.aureus*, seguidas de virus (25%) y hongos (7%).^{273,274,276,278,279} La elevada frecuencia de infecciones en la LLC es debida en parte, a una profunda alteración de múltiples componentes de la respuesta inmune, que incluyen tanto elementos celulares como solubles de las respuestas innata y adaptativa; además, la inmunodeficiencia que padecen los pacientes con LLC se agrava con el paso del tiempo, incluso en ausencia de progresión clínica a estadios más avanzados de la enfermedad.^{263,273,274,276,280,281}

Desde el punto de vista de la respuesta celular, se ha descrito un incremento en el número absoluto de linfocitos T, tanto CD4⁺ como CD8⁺; además, llama la atención que dentro del aumento global de las poblaciones de linfocitos T, se haya evidenciado un incremento significativo del número de linfocitos T reguladores, los cuales podrían favorecer la supresión de la respuesta inmune.²⁸²⁻²⁸⁷ No obstante, pese a que los linfocitos T en general (tanto las poblaciones T globales CD4⁺ como CD8⁺) están incrementados en número, presentan diversas alteraciones funcionales.²⁸⁸⁻²⁹⁸ Así, gran parte de los linfocitos T de pacientes con LLC muestran características fenotípicas y funcionales de “agotamiento”, que se traducen en una capacidad

proliferativa reducida *in vitro*, una alteración en su patrón de producción de citocinas y una incapacidad para generar sinapsis inmunológicas eficientes.^{295–297,299,300} Sorprendentemente, en estos mismos pacientes, las poblaciones de linfocitos T que responden frente a citomegalovirus (CMV) mantienen una capacidad proliferativa y funcional (i.e. producción de citocinas) normales; estos hallazgos, junto con otras evidencias que se describirán con más detalle en secciones posteriores de esta introducción, han llevado a sugerir la posible implicación de este patógeno en la ontogenia de la enfermedad, de manera análoga a la relación existente entre el virus de Epstein-Barr (VEB) y el linfoma de Hodgkin, o la asociación entre la leucemia/linfoma T del adulto y el virus linfotrópico de células T humano (HTLV-1).^{301–307} Por otra parte, el número de células NK circulantes en SP se encuentra también aumentado en la LLC, aunque funcionalmente estas células se encuentran alteradas, mostrando una capacidad citotóxica limitada.³⁰⁸ Desde el punto de vista de la respuesta humoral, 40% de los pacientes presentan niveles reducidos de proteínas del complemento, y entre un 25-80% de los casos presentan hipogammaglobulinemia, que se agrava con la progresión de la enfermedad.^{309–315}

En la actualidad se desconocen cuáles son los mecanismos específicos que conducen a esta profunda alteración de la respuesta inmunológica en la LLC. No obstante, múltiples evidencias apuntan a que estas alteraciones podrían estar relacionados con una actividad inmunosupresora propia aumentada, capaz de modular la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, a través de múltiples mecanismos, que serían responsables, entre otros efectos, de impedir la formación de sinapsis inmunológicas funcionales con linfocitos T, favorecer un patrón de activación T_{h2} (en detrimento del patrón T_{h1}), asociado a un incremento de linfocitos T reguladores, capaces de inducir una mayor modulación (negativa) de la respuesta inmune.^{298,316,317} Además de favorecer estas alteraciones, las células B clonales aprovecharían estos cambios para potenciar la generación de un micromedioambiente favorable al establecimiento de una sinergia entre los diferentes componentes de la respuesta inmune y el tumor, que facilitaría en último término, su persistencia y crecimiento.^{318–321}

Además de las alteraciones del sistema inmune inherentes a la propia enfermedad, la mayor parte de los tratamientos disponibles hasta la fecha acentúan aún más si cabe, el estado de inmunodeficiencia de los pacientes con LLC, favoreciendo la aparición de procesos infecciosos por agentes oportunistas.^{322–327} La forma más efectiva de potenciar la respuesta

inmune en estos pacientes sería a través de la vacunación o la administración de inmunoglobulina intravenosa (Iglv) o subcutánea (IgSc). Desgraciadamente, diferentes estudios han demostrado una respuesta a la vacunación subóptima en pacientes con LLC, de tal manera que no suelen alcanzar niveles plasmáticos adecuados de Ig específica del patógeno frente al que se han vacunado.^{218,328-330} En esta misma línea, existe actualmente un debate abierto sobre el coste-beneficio de la terapia de reemplazamiento con Igs en la LLC, ya que se ha demostrado protección frente a infecciones bacterianas, pero no víricas.³³¹⁻³³⁶

Además de las manifestaciones autoinmunes e infecciosas, en los pacientes con LLC se observan con mayor frecuencia también, otros tumores (sólidos), con un riesgo estimado de 1,2 a 3 veces superior al de la población general de la misma edad; esta mayor frecuencia de segundos tumores, podría estar también relacionada con el estado de inmunodeficiencia secundaria que padecen estos individuos.³³⁷⁻³⁴⁰

3.5. Características morfológicas y fenotípicas

Desde el punto de vista morfológico, las células de la LLC típica presentan el aspecto de linfocitos de pequeño tamaño, con escaso citoplasma (cociente núcleo:citoplasma elevado) y un núcleo redondeado y denso, sin nucléolos visibles, y que generalmente muestra pequeñas regiones de heterocromatina.^{341,342} Una característica singular de la LLC es que en un frotis de SP podemos encontrar restos de núcleos de linfocitos clonales “rotos”, que se generan como consecuencia de la ruptura de las membranas plasmáticas de los linfocitos tumorales (más lábiles que las de los normales) en el momento de hacer la extensión de sangre. Estos restos celulares se denominan “sombras de Gumprecht”, y constituyen un rasgo morfológico característico de la enfermedad.³⁴³

Respecto al inmunofenotipo de la célula tumoral de la LLC, este es también muy característico en las formas típicas; consiste en la expresión del marcador pan-B CD19, asociado a la positividad débil de CD20 y otros marcadores relacionados con el BCR, como CD81, CD79b, sIgM y/o sIgD.³⁴³⁻³⁴⁵ La característica fenotípica más reseñable, aunque no específica de estas células, es la expresión de CD5. Así, por ejemplo, las células B tumorales del LCM también expresan CD5, por lo cual, para poder hacer una correcta distinción (diagnóstico diferencial) entre ambas entidades es necesario el uso de marcadores mutuamente excluyentes, como es el caso

de CD200, CD23 y CD43 que se expresan en la práctica totalidad de las LLC, siendo negativos en el LCM y en la mayoría de los linfomas foliculares.³⁴⁶⁻³⁵⁰ Además, la LLC se caracteriza también por la expresión fuerte de otros marcadores, como CD21, CD24, CD25, CD27, CD39, CD40, CD45RA, CD62L, CD185 (CXCR5) y Bcl-2 (este último expresado a nivel intracitoplasmático). Menos frecuentemente, es posible encontrar casos que difieren del perfil inmunofenotípico anteriormente expuesto (e.g. CD23⁻, CD5⁻, FMC7⁺/CD20⁺ y/o CD79b⁺) y que corresponderían a las denominadas LLC de fenotipo atípico. En las células tumorales de la LLC, también nos podemos encontrar marcadores con un grado de expresión variable, como CD11c, CD38, CD49d, CD80, CD95, CD124, CD126 y CD130.^{183,351-360}

3.6. Alteraciones genéticas

Desde el punto de vista genético, la LLC es también una enfermedad heterogénea. Así, entre 60% y 80% de las LLC presentan alteraciones citogenéticas, de las que merece destacar la ganancia de cromosomas completos, como la trisomía 12, o más frecuentemente, la pérdida de material genético de los cromosomas 11, 13 y 17 –del(13q14), del(11q)(*ATM*) y del(17p)(*TP53*)–.³⁶¹⁻³⁶⁷

De todas estas alteraciones citogenéticas, la más frecuente es la del(13q14), presente en 35%-55% de los casos. De forma sistemática, en la del(13q14) de la LLC existe pérdida de un segmento de ADN denominado “región mínima delecionada” (MDR, del inglés “*Minimal Deleted Region*”) que incluye dos ARNs no codificantes (miR-15a y miR-16-1; *cluster* miR15/16), con función supresora de tumor, al ser capaces de unir y degradar ARNm que codifica para proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2;³⁶⁸⁻³⁷⁴ además, en la del(13q14) también resulta delecionado en aproximadamente un 20-25% de todos los casos, el gen supresor de tumor *RB1*. La segunda alteración citogenética más frecuente en la LLC es la trisomía 12 –que puede aparecer aislada o asociada a otras alteraciones–, presente en un 16-23% de los casos, mientras que la del(11q)(*ATM*) y la del(17p)(*TP53*) están presentes en aproximadamente 11% y 7% de las LLC, respectivamente (Tabla 2).³⁶¹⁻³⁶⁷

Hoy se conoce que estas alteraciones citogenéticas afectan a genes implicados en diferentes procesos de vital importancia para la célula, como son entre otros, la regulación del

ciclo celular, procesos de reparación del ADN y/o la activación de vías de señalización inductoras de proliferación y/o supervivencia.

Tabla 2 | Frecuencia de las principales alteraciones citogenéticas descritas en LBM y LLC

Alteración citogenética	Función del gen (o genes) afectado(s)	Frecuencia		
		LBM ^{lo}	LBM ^{hi}	LLC
del(13q14)(D13S25)	Cluster miR15/16: regulación de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 RB1: regulación de la entrada en la fase S del ciclo celular. Actúa como gen supresor de tumor.	26-44%	29-58%	35-55%
Trisomía 12	Posible sobreexpresión de genes asociados a la regulación del ciclo celular y apoptosis localizados en este cromosoma (e.g. de CDK4, STAT6 o p27, entre otros).	4-7%	12-21%	16-23%
del(11q)(ATM)	ATM: gen supresor de tumor relacionado con la detección y reparación de daño en ADN. MLL: histona metiltransferasa responsable de regular la expresión génica.	0%	0-8%	6-18%
del(17p)(TP53)	TP53: gen supresor de tumor que regula el ciclo celular y favorece la entrada en apoptosis tras detectar daño celular (e.g. en ADN)	0-13*%	0-4%	2-16%

*Información obtenida de una serie con tan solo 16 individuos analizados, de los cuales 2/16 presentaron dicha alteración. **LBM^{lo}**: linfocitosis B monoclonal de bajo recuento; **LBM^{hi}**: linfocitosis B monoclonal de elevado recuento; **LLC**: leucemia linfática crónica.

Así, a modo de ejemplo, la del(11q)(ATM) afecta al gen *ATM* (y en algunos casos además al gen *MLL*), implicado en la reparación del ADN; a su vez, la del(17p)(*TP53*) provoca la pérdida de (al menos) una copia del gen supresor de tumor *TP53*, gen que participa en diversas funciones fisiológicas celulares encaminadas a mantener la integridad y estabilidad genómica, de manera que su pérdida favorece la supervivencia y proliferación de células genéticamente alteradas (Tabla 2).³⁷⁵⁻³⁷⁷

En los últimos años, el empleo de técnicas de secuenciación masiva (*NGS*, del inglés “*Next Generation Sequencing*”), ha permitido identificar múltiples mutaciones somáticas adicionales, presentes en frecuencias variables en el genoma de la LLC. De las casi 1.000 mutaciones identificadas en cada genoma estudiado, tan solo 10-20 de ellas constituyen mutaciones no silentes, es decir, mutaciones genéticas que modifican la secuencia de

aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes alterados, lo cual supone una frecuencia mucho más baja de mutaciones que la encontrada en la mayor parte de los tumores sólidos y en otras neoplasias hematológicas.^{378,379} En este contexto, merece destacar sin embargo, que no se han identificado genes alterados (o mutaciones específicas) comunes a todas las LLC, ni siquiera a una proporción elevada de las mismas, lo cual indica que estas mutaciones (al igual que las alteraciones citogenéticas descritas anteriormente), no constituirían alteraciones genéticas/moleculares primarias, responsables directas de la transformación neoplásica y/o la progresión maligna de la célula tumoral. Pese a la ausencia de alteraciones genéticas comunes, hasta el momento se han identificado en conjunto cerca de treinta genes que están mutados de forma recurrente en la LLC, siendo las mutaciones más frecuentemente identificadas las que afectan a los genes *SF3B1* (*splicing factor 3B-1*; 9,7-21%), *NOTCH1* (6-13,4%), *MYD88* (*myeloid differentiation primary response 88*; 3-10%), *XPO1* (*exportin-1*; 2,4-4%) y *KLHL6* (*Kelch-like protein 6*; 1,8%) (Tabla 3).³⁸⁰⁻³⁹²

Los genes antes referidos como mutados en LLC, están implicados en diferentes vías de señalización, que de manera similar a lo descrito para las alteraciones citogenéticas, afectan a procesos vitales para la célula (i.e. ciclo celular, supervivencia y/o reparación de ADN, entre otras funciones). A modo de ejemplo, las mutaciones en *NOTCH1* se han asociado con una activación exacerbada de la vía de señalización mediada por BCR, lo que conduce a una mayor supervivencia y proliferación de las células B tumorales.^{387,393}

3.7. BCR y vías de señalización mediadas por BCR y otros receptores de membrana e intracelulares

El BCR es el receptor clonotípico del linfocito B, y por tanto el receptor fundamental a través del cual esta célula lleva a cabo su función inmunológica consistente en el reconocimiento específico de Ags y la transducción de la señal de activación, con la correspondiente respuesta efectora. Además, el BCR desempeña también un importante papel en la proliferación, diferenciación y supervivencia de la célula B. La naturaleza “ha ideado” un sistema que permite que el BCR de cada linfocito sea único y diferente al de los demás linfocitos B, asegurando de esta manera una gran diversidad en los mismos, tan elevada como la cantidad de Ags que

podríamos encontrar en nuestro ambiente y contra los que la célula B debería ser capaz de responder.^{357,394-397}

Tabla 3 | Frecuencia de mutaciones recurrentes asociadas a LLC (descritas en al menos 2 casos) en LBM^{lo}, LBM^{hi} y LLC.

Gen	Localización	Función	Frecuencia de casos mutados		
			LBM ^{lo}	LBM ^{hi}	LLC
SF3B1	2q33.1	Splicing de ARN	0%	1,5% - 10%	9,7% - 21%
ATM	11q22.3	Serina/treonina quinasa	0%	0% - 12,5%	8% - 15%
TP53	17p13.1	Supresor tumoral/apoptosis, reparación del ADN	0%	0%	7% - 15%
NOTCH1	9q34.3	Desarrollo/maduración	0%	6% - 11%	6% - 13,4%
MYD88	3p22.2	Proteína adaptadora de vías de señalización	0%	0% - 4%	2,9% - 10%
POT1	7q31.33	Protección de los telómeros	0%	2% - 15%	4% - 5%
CHD2	15q26.1	Alteración de la estructura de la cromatina	n.d.	8%	4% - 5%
LRP1B	2q22.1-q22.2	Receptor de lipoproteínas/ desarrollo	n.d.	n.d.	4,8%
BRAF	7q34	Serina/treonina quinasa	n.d.	4%	4%
BIRC3	11q22.2	Inhibidor de apoptosis	0%	0% - 8%	4%
RPS15	19p13.3	Componente de la subunidad 40S de los ribosomas	n.d.	n.d.	4%
ZMYM3	Xq13.1	Dedo de zinc de complejos histona deacetilasa/silenciamiento génico	n.d.	n.d.	3% - 4%
XPO1	2p15	Transporte de proteínas entre núcleo y citoplasma	0%	0%	2,4% - 4%
FBXW7	4q31.3	Parte del complejo ubiquitin protein ligasa	0%	4% - 7,7%	2% - 4%
RIPK1	6p25.2	Serina/treonina quinasa	n.d.	n.d.	3%
MAPK1	22q11.22	Amplificación vías de señalización ERK/proliferación y diferenciación	n.d.	n.d.	3%
MGA	15q15.1	Factor de transcripción	n.d.	n.d.	3%
DDX3X	Xp14.4	Regulación de la transcripción/splicing/exportación ARNm	n.d.	8%	2% - 3%
KRAS	12p12.1	GTPasa	n.d.	4%	2% - 3%
NRAS	1p13.2	Transducción de la señal/regulación del ciclo celular	n.d.	n.d.	2% - 3%
BCOR	Xp11.4	Formación del centro germinal/apoptosis	n.d.	n.d.	2% - 3%
SAMHD1	20q11.23	Regulación de la respuesta inmune innata	n.d.	n.d.	2% - 3%
MED12	Xq13.1	Componente del complejo pre-iniciador de la transcripción	n.d.	4%	2%
ITPKB	1q42.12	Metabolismo/activación de vías de señalización	n.d.	n.d.	2%
MAP2K1	15q22.31	Amplificación vías de señalización ERK/proliferación y diferenciación	n.d.	n.d.	2%
FUBP1	1p31.1	Factor de transcripción	n.d.	n.d.	2%
NXF1	11q12.3	Factor de exportación nuclear	n.d.	n.d.	2%
IRF4	6p25.3	Factor de transcripción/regulación de la respuesta inmune	n.d.	n.d.	2%
EGR2	10q21.3	Factor de transcripción	0%	0% - 4%	1%- 3%
HIST1H1E	6p22.2	Histona	n.d.	0%	1% - 3%
KLHL6	3q27.1	Señalización a través de BCR/maduración de linfocitos B en centro germinal	n.d.	n.d.	1,8%
PTPN11	12q24.13	Proteína tirosina fosfatasa/mitosis/diferenciación	n.d.	n.d.	1%
DYRK1A	21q22.13	Vías de señalización/regulación del ciclo celular/proliferación	n.d.	n.d.	1%

LBM^{lo}: linfocitosis B monoclonal de bajo recuento; LBM^{hi}: linfocitosis B monoclonal de elevado recuento; LLC: leucemia linfática crónica; n.d.: no hay datos publicados.³⁸⁰⁻³⁹²

En contraposición con la gran diversidad del BCR de los linfocitos B normales, en las células B clonales de la LLC se ha observado una restricción de uso de determinados BCRs, presentando estos una menor diversidad (es decir, un repertorio de BCR más restringido) con el uso de familias de BCR, en general diferentes de los de las células B normales CD5⁺.³⁹⁸ Además, en las células B tumorales se ha constatado un uso preferencial y combinado de determinados segmentos V, D y J de *IGH* (que son responsables de componer la región variable del BCR, y por tanto responsables de la identificación del Ag) y que incluyen por ejemplo, la asociación entre *IGHV1-69*, *IGHD3-3* e *IGHJ6*.³⁹⁹⁻⁴⁰¹

Desde hace tiempo sabemos que en una tercera parte de las LLC, el BCR de las células B tumorales presenta secuencias de aminoácidos en las regiones determinantes del reconocimiento antigénico (CDR, del inglés “*complementary determining region*”) altamente conservadas, e incluso idénticas entre diferentes pacientes; a estos BCR se les conoce como “BCR estereotipados”.⁴⁰²⁻⁴¹⁰ Desde el punto de vista biológico, la existencia de secuencias idénticas, por ejemplo de CDR3, entre individuos no relacionados, es muy improbable (prácticamente imposible), lo que indica que su selección no es debida al azar, sino que deben existir factores que conducen a la expansión específica de las células B que contienen estos BCRs estereotipados. Teniendo en cuenta el papel del BCR en el reconocimiento específico de Ags, la existencia de LLC con BCR estereotipados apoyaría la posible participación de un estímulo antigénico mediado por BCR en la ontogenia de esta neoplasia.^{404,405,411-413}

En los últimos años se ha buscado determinar qué posibles Ags (extraños o autoantígenos) podrían ser reconocidos de manera específica por los BCRs de las células tumorales de la LLC, y especialmente por los BCRs estereotipados. Sin embargo, los resultados de estos estudios indican que algunos de los BCRs estereotipados son altamente polirreactivos, ya que reconocen antígenos de diversa naturaleza: ADNdc, ADNcs, histonas o cardiolipina, entre otros.⁴¹⁴⁻⁴¹⁶ Por el contrario, estudios más recientes muestran que algunos BCRs (como los BCR estereotipados *IGHV1-69* o *IGHV3-21*) presentan una reactividad fuerte y específica frente al antígeno pUL32 de CMV, mientras que los receptores que usan la familia *IGHV3-7* muestran especificidad frente a componentes polisacáridicos característicos de hongos β -(1,6)-glucano-, y otros BCRs (como *IGHV1-69/IGHD3-16/IGHJ3*) son altamente específicos frente a proteínas propias, como la miosina no muscular de tipo IIA (MYHIIA).⁴¹⁷⁻⁴²¹ La identificación de un BCR

altamente específico frente al Ag pUL32 de CMV, unido a la mayor prevalencia de seropositividad frente a este patógeno en algunas series de pacientes con LLC, y la persistencia en el plasma de estos sujetos de anticuerpos específicos frente a CMV, sugiere la existencia de una relación (directa o indirecta) de este virus con la LLC, aunque existe controversia al respecto.^{411,422,423} Pese a esta asociación, no podemos descartar que otros agentes infecciosos, e incluso autoantígenos, sean responsables de la aparición y/o mantenimiento de estas poblaciones de células B clonales, al menos en las primeras fases de la ontogenia de la LLC.^{411,424} No obstante lo anteriormente expuesto, si exceptuamos las evidencias existentes sobre la asociación (controvertida) entre determinados BCRs y antígenos concretos, demostrada únicamente de forma ocasional, hasta la fecha no se ha identificado de forma fehaciente la naturaleza de los Ags específicos que pudieran ser reconocidos por los BCRs leucémicos de las células tumorales de pacientes con LLC.

En este contexto, cabe señalar también que en la LLC, el “estado mutacional” del BCR, es decir, el grado de identidad de la secuencia de nucleótidos de la región variable de *IGHV* con respecto a la línea germinal, es variable. Así, en cerca del 50% de los casos, la identidad de la secuencia *IGHV* tumoral vs. germinal es de <98% –receptores con secuencia mutada del BCR (*IGHVm*)–, mientras que en la otra mitad de los casos, la identidad es ≥98% –receptores con secuencia no mutada del BCR (*IGHVnm*)–, lo cual, como veremos en secciones posteriores, está relacionado con el pronóstico de la enfermedad.

La activación de las vías de señalización celular mediadas por BCR se relaciona con una mayor proliferación y supervivencia de las células B normales; ambas características celulares (proliferación y supervivencia incrementadas) habitualmente se asocian también a transformación/progresión maligna. Por todo esto y lo anteriormente expuesto, cabe plantearse que la activación de la vía de señalización de BCR podría constituir un elemento fundamental en la activación y expansión de las células B tumorales de pacientes de LLC, al menos en fases iniciales de la enfermedad. Actualmente sabemos que existe una activación tónica constante del BCR de las células tumorales de la LLC, que se asocia con la fosforilación constitutiva de Syk y NF-κB, mientras que aproximadamente la mitad de los casos muestra activación constitutiva de Erk.^{425–429} Sin embargo, la respuesta de los linfocitos B tumorales de pacientes con LLC a la activación inducida por estímulos (“*in vitro*”) es muy heterogénea.⁴²⁴ Así, mientras que en algunos

casos, la activación a través de BCR se asocia a sobreexpresión de un elevado número de componentes del “señalósoma” (e.g. Lyn, Syk o Btk, ente otros), relacionado con un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y la activación de la vía de Akt –lo cual a su vez desencadena una amplificación de la señal transducida vía BCR (asociada a mayor proliferación y supervivencia de la célula tumoral)–, en otras LLC la activación del BCR tumoral conduce a una respuesta celular deficiente, similar a la observada en linfocitos B anérgicos.^{427,428,430–432}

Además de la vía de señalización mediada por BCR, se ha descrito la posible participación de otras vías de señalización en la (inducción de la) expansión de la célula B tumoral, al favorecer su proliferación y supervivencia. Así, en la LLC se ha descrito la activación de las vías de Wnt-catenina y de Notch, asociadas ambas a una mayor supervivencia celular.^{393,433,434} Además, la relación con el micromedioambiente, ya sea mediante contacto célula-célula, o a través de la captación de factores solubles (como citocinas), conduciría al mantenimiento y/o proliferación de las células tumorales en determinados nichos.^{63,319,435,436}

3.8. Clasificación pronóstica de la LLC

Como se ha mencionado en secciones anteriores de esta memoria, la LLC es una enfermedad muy heterogénea, también desde el punto de vista pronóstico, lo que se traduce en que, si bien la mediana de supervivencia para el conjunto de los sujetos con LLC es de unos 10 años, la supervivencia es muy variable entre distintos pacientes, oscilando desde unos pocos meses a varias décadas.²²⁰ Por este motivo, para el correcto manejo clínico de los pacientes con LLC, es necesaria su estratificación en función del riesgo pronóstico, ya desde el momento del diagnóstico de la enfermedad.

Actualmente disponemos de diferentes sistemas de clasificación pronóstica para pacientes con LLC, de los que los más extendidos siguen siendo los sistemas clásicos propuestos por Rai et al.²²³ y Binet et al.²²⁴ hace más de 30 años (Tabla 4). En el primero de ellos, los pacientes con LLC se clasifican en cinco subgrupos de diferente riesgo pronóstico (estadios 0-IV; Tabla 4), mientras que en la clasificación de Binet los pacientes se distribuyen en tres categorías, denominadas de riesgo bajo (estadio A), intermedio (estadio B) y alto (estadio C) (Tabla 4), en función de si presentan afectación de menos de 3 (estadio A) vs. ≥ 3 áreas

ganglionares (estadio B) y de la presencia o no de citopenias (estadio C), con medianas de supervivencia de 8-12 años, 4-7 años y 2-4 años, respectivamente.^{220,224,437,438}

Tabla 4 | Sistemas de clasificación pronóstica de Rai y Binet.

<i>Sistema de clasificación</i>	<i>Estadio</i>	<i>Características clínicas</i>	<i>Mediana de supervivencia estimada.</i>
Sistema de Rai et al. ²²³	0 (riesgo bajo)	Linfocitosis	9,5- >12 años
	I (riesgo bajo)	Linfocitosis y adenopatías, en ausencia de esplenomegalia o hepatomegalia.	6-8 años
	II (riesgo intermedio)	Linfocitosis, esplenomegalia y/o hepatomegalia. Valores de hemoglobina >100g/L y >10x10 ⁹ plaquetas/L.	6-7 años
	III (riesgo alto)	Linfocitosis en presencia de anemia (hemoglobina <100 g/L).	1-4 años
	IV (riesgo alto)	Linfocitosis en presencia de trombopenia (<10x10 ⁹ plaquetas/L)	1-4 años
Sistema de Binet et al. ²²⁴	A (riesgo bajo)	Linfocitosis con <3 áreas ganglionares afectadas. Ausencia de anemia y/o trombopenia.	8-12 años
	B (riesgo intermedio)	Linfocitosis con ≥3 áreas ganglionares afectadas. Ausencia de anemia y/o trombopenia.	4-7 años
	C (riesgo alto)	Presencia de anemia y/o trombopenia	2-4 años

*Las cifras de hemoglobina y plaquetas empleadas para definir anemia y trombopenia son idénticas a las de la clasificación de Rai et al., respectivamente.

Los sistemas de clasificación de Rai et al. y Binet et al. permiten agrupar a los pacientes con LLC en función del riesgo pronóstico, de una forma sencilla, barata, reproducible y clínicamente útil, lo que ha favorecido su uso. No obstante, en ambas clasificaciones, los grupos de riesgo siguen siendo clínicamente heterogéneos, y en ellas no se tienen en consideración factores biológicos dependientes de las propias células tumorales o parámetros de respuesta al tratamiento, que pudieran reflejar de forma más precisa dicha variabilidad dentro de cada estadio.

Por este motivo, en las últimas décadas se ha tratado de identificar factores pronósticos adicionales y complementarios a ambas clasificaciones. En este contexto, merece destacar parámetros asociados a características biológicas de la célula leucémica (como las alteraciones genéticas de la célula tumoral, el estado mutacional del BCR de la célula tumoral o la presencia de determinados estereotipos de BCR), entre otros factores con impacto pronóstico, que se describen a continuación (Tabla 5).

Tabla 5 | Factores pronósticos en pacientes con LLC.

Factor pronóstico	Riesgo clínico	
	BAJO	ALTO
Edad	≤65 años	>65 años
Sexo	Mujeres	Hombres
Estadio clínico	Rai 0-I Binet A	Rai II, III, IV Binet B o C
Características morfológicas y fenotípicas:		
Patrón de infiltración de la médula ósea	Patrón no difuso	Patrón difuso
Morfología de los linfocitos	Típica	Atípica
Expresión de CD38 (% de células positivas)	<20-30%	>20-30%
Expresión de ZAP-70	Baja	Alta
Expresión de CD49d	Baja	Alta
Marcadores séricos:		
Nivel de β2-microglobulina en plasma	Bajo (< 2,5 mg/L)	Alto (> 2,5 mg/L)
Nivel de CD23 soluble en plasma	Bajo (< 574 U/mL)	Alto (>574 U/mL)
Nivel sérico de Timidin Kinasa	Bajo (< 7,1UI/L)	Alto (> 7,1UI/L)
Nivel de TACI en plasma	Bajo	Alto
Lesiones genéticas:		
Alteraciones citogenéticas	del(13q14) ausencia de alteraciones	del(11q) del(17p) <i>NOTCH1</i>
Mutaciones	Ausencia de mutaciones	<i>SF3B1</i> <i>TP53</i>
Otros:		
Estado mutacional del gen <i>IGHV</i>	Mutado (<98% de identidad)	No mutado (≥98% de identidad)
Presencia de secuencias estereotipadas del BCR	Cluster #4	Cluster #1, #2, #8
Tiempo de duplicación linfocitaria	>12 meses	<12 meses
Índice Pronóstico Internacional (IPI):		
Variables pronosticas en el IPI	<65 años Binet A ≤3,5 mg/L de β2-microglobulina <i>IGHV</i> mutado Sin mutaciones en <i>TP53</i> (Supervivencia ≈93%)	≥65 años Binet B o C >3,5 mg/L de β2-microglobulina <i>IGHV</i> no mutado Mutaciones en <i>TP53</i> (Supervivencia ≈23%)

Con respecto al Índice Pronóstico Internacional, los valores que se atribuyen a cada variable para calcular el *score* son los que se indican a continuación: edad ≥65, 1 punto; Binet B o C, 1 punto; β2-microglobulina >3,5 mg/L, 2 puntos; *IGHV* no mutado, 2 puntos; mutaciones en *TP53*, 4 puntos.

Edad, sexo y estado general de los pacientes. Al ser la LLC una enfermedad característica de fases avanzadas de la vida, la edad es un factor pronóstico relevante, mostrando los pacientes de más edad (> 65 años) un peor pronóstico. Asimismo, el sexo masculino se ha considerado también clásicamente como un factor de riesgo adverso (vs. sexo femenino), lo mismo que ocurre con un estado general más deteriorado (ECOG ≥1) en el momento del diagnóstico, que constituye también un factor pronóstico desfavorable en la LLC.⁴³⁹

Características morfológicas y fenotípicas de las células tumorales. Además de los criterios morfológicos que clásicamente se han asociado a peor pronóstico (como son un patrón

difuso de infiltración de la MO y una morfología atípica de los linfocitos B tumorales), desde el punto de vista fenotípico se han identificado marcadores cuya expresión se asocia con el pronóstico de la enfermedad. Entre estos marcadores cabe señalar CD38, CD49d y ZAP-70, cuya expresión se ha asociado con un curso clínico más agresivo,^{355,356,440–445} posiblemente debido a que la activación de estas moléculas refleja una amplificación de las vías de señalización mediadas por BCR, lo que se traduce en una mayor activación de la célula tumoral. Por el contrario, la expresión del receptor inhibitor CD305 se ha asociado con un curso clínico más favorable.⁴⁴⁶

Parámetros bioquímicos plasmáticos. Entre los distintos parámetros bioquímicos que se han asociado con la evolución clínica de la LLC, merece destacar los niveles séricos incrementados de β 2-microglobulina y de CD23 soluble, asociados ambos de forma recurrente con un peor pronóstico de la enfermedad;^{164,447–451} en este contexto, cabe señalar además que en prácticamente todos los estudios en los que se ha investigado el impacto pronóstico de la β 2-microglobulina soluble, se ha demostrado el valor pronóstico independiente del incremento de sus niveles plasmáticos.

Alteraciones genéticas. Las alteraciones citogenéticas constituyen uno de los parámetros con mayor relevancia pronóstica en la LLC, ya que permiten la subclasificación de estos pacientes en distintos subgrupos de riesgo, independientemente de su estadio clínico.^{220,221,227,361,366} Así, la identificación de del(13q14), al igual que la ausencia de alteraciones citogenéticas, se asocian ambas con un curso clínico favorable; por el contrario la del(11q)(*ATM*), y/o sobre todo la del(17p)(*TP53*), están asociadas a un acortamiento significativo del tiempo que transcurre desde el diagnóstico hasta el tratamiento (TT) y a una menor supervivencia global (SG). A su vez, la trisomía 12 se ha asociado a un pronóstico intermedio, entre el observado para las alteraciones citogenéticas de bajo riesgo –i.e. del(13q14)– y las de alto riesgo –i.e. del(11q)(*ATM*) y del(17p)(*TP53*)–.^{361,452,453} Pese al impacto pronóstico que tiene la presencia (vs. ausencia) de estas alteraciones citogenéticas, para determinar de forma precisa su verdadera utilidad pronóstica debe considerarse además el número de alteraciones citogenéticas presentes en la misma célula, el porcentaje de células tumorales afectadas por cada una de las alteraciones anteriormente referidas, el número de alelos afectados, e incluso, la extensión de las deleciones identificadas (dependiendo del tamaño de la región cromosómica delecionada pueden variar

significativamente los genes afectados por la misma).^{367,454-458} El significado pronóstico de otras alteraciones citogenéticas menos frecuentes (presentes en 1-6% de los casos), sigue sin conocerse con precisión. Entre estas alteraciones se incluyen: i) la amplificación de las regiones cromosómicas 8q24 (4%) y 3q26 (6%), que afectan a los genes *MYC* y *PIK3CA*, respectivamente, ii) la del(8p) (5%) y la del(6q) (7-10%), que asocia pérdida del gen *AIM1*, y iii) la t(14q32) (5%) que involucra al gen *IGH*.⁴⁵⁹⁻⁴⁶⁵

Además de las alteraciones citogenéticas referidas, en los últimos años se han identificado algunas **mutaciones somáticas** que, cuando están presentes en las células de la LLC (Tabla 3), se relacionan con el pronóstico de la enfermedad. Entre ellas se incluyen las mutaciones de *NOTCH1*, *SF3B1* o *TP53* –siendo esta última un factor pronóstico adverso independiente de la presencia de del(17p)(*TP53*)–,⁴⁶⁶⁻⁴⁶⁸ relacionadas con un TT y una SG significativamente más cortos, y en el caso de las mutaciones de *TP53* también, con refractariedad al tratamiento con fludarabina y ciclofosfamida.⁴⁶⁹ Asimismo, se ha evidenciado la existencia de una asociación entre algunas de estas mutaciones somáticas y ciertas alteraciones citogenéticas, siendo ejemplo de ello la asociación descrita entre las mutaciones en *NOTCH1* y la trisomía 12 o la del(17p)(*TP53*), una situación que conduce a una sinergia en la alteración de las vías de señalización de la célula tumoral y una mayor tasa de transformación a linfoma B difuso de célula grande (i.e. síndrome de Richter).⁴⁷⁰⁻⁴⁷³ No obstante, la coexistencia de alteraciones citogenéticas con múltiples mutaciones puntuales, dificulta el conocimiento del verdadero significado biológico y clínico de cada una de las alteraciones individuales.^{382,474-477} Además, estudios recientes demuestran que las alteraciones genéticas de las células de la LLC varían durante el curso de la enfermedad, lo que dificulta aún más si cabe, nuestra comprensión de la biología de la enfermedad, y demanda un manejo clínico dinámico de los pacientes que tenga en cuenta estas variaciones.^{386,389,478,479}

Estado mutacional del gen *IGHV* y presencia de BCR estereotipados. Desde hace tiempo se conoce que los pacientes con LLC cuyas células tumorales presentan BCRs con *IGHV*nm tienen un curso clínico más desfavorable, con un TT y una SG significativamente más cortos que los observados en pacientes con receptores *IGHV*m.^{221,480,481} En este sentido, también se ha descrito que determinadas combinaciones de segmentos *VDJ* del BCR, incluidos algunos BCR estereotipados como los estereotipos #1 y #2, se asocian con el pronóstico de la

enfermedad. Ambos estereotipos corresponden a los dos subgrupos más prevalentes de BCR estereotipados (5,5% de todas las LLC),^{405,482,483} las LLC con BCR estereotipado del grupo #1 y secuencias *IGHV*_m se asocian a del(17p)(*TP53*) y expresión fuerte de ZAP-70, CD38 y CD49d,^{480,483–485} mientras que los casos pertenecientes al clúster #2 de BCR estereotipados, independientemente de su estado mutacional, muestran con mayor frecuencia del(13q14) y del(11q)(*ATM*) junto con mutaciones en *SF3B1*. En su conjunto, los pacientes con BCR de los estereotipos #1 y #2 muestran un TT significativamente acortado de 19 y 23 meses, respectivamente.^{469,484,486} Por el contrario, el clúster de BCRs estereotipados #4 está integrado por pacientes jóvenes con *IGHV*_m y que muestran un mejor pronóstico que aquellos pacientes con BCRs no estereotipados y características pronósticas similares (TT de ≈11 vs. 4 años, respectivamente).^{483,484,487}

Persistencia de enfermedad mínima residual. Desde hace más de una década se identificó la presencia de enfermedad mínima residual como un factor pronóstico independiente en las LLC tratadas.^{488–490} Así, actualmente se reconoce que la persistencia de células tumorales residuales, identificables mediante técnicas de sensibilidad $>10^{-4}$, en SP y/o MO, constituye un factor pronóstico adverso en la LLC, independientemente del tratamiento administrado. No obstante, esta información no está disponible en el momento del diagnóstico.

Nuevos sistemas de clasificación pronóstica de la LLC. Teniendo en consideración el conjunto de los parámetros clínico-biológicos asociados con el pronóstico de la LLC, en los últimos años se han propuesto nuevos sistemas de clasificación pronóstica^{232,357,491–495} que reflejan de forma más precisa que los sistemas de clasificación convencional de Rai y Binet, la variabilidad pronóstica de la enfermedad. Entre los diferentes sistemas pronósticos propuestos, destaca especialmente el denominado Índice Pronóstico Internacional (IPI).⁴⁹⁶ Para el diseño y generación de este sistema de estratificación pronóstica de la LLC se analizó el impacto pronóstico de un amplio número de características clínicas, moleculares, fenotípicas y citogenéticas relacionadas con el pronóstico en la LLC en más de 3.400 pacientes de todo el mundo, identificándose 5 parámetros –edad del paciente, estadio clínico de la enfermedad, niveles plasmáticos de $\beta 2$ -microglobulina soluble, estado mutacional del BCR y presencia o no de alteraciones en *TP53*–, que considerados de manera combinada, y según el peso específico de cada parámetro incluido de manera individualizada, permiten determinar de manera precisa

el riesgo pronóstico –i.e. bajo (score de 0 y 1 puntos), intermedio (score de 2 a 3 puntos), alto (score de 4 a 6 puntos) y muy alto (score de ≥ 7 puntos)–, reflejado en distinta probabilidad de supervivencia a 5 años (Tabla 5).

4. RELACIÓN ONTOGÉNICA ENTRE LBM Y LLC

Desde hace una década se conoce que prácticamente todas las LLC (98%) están precedidas por una LBM^{hi}, siendo la tasa de transformación de LBM^{hi} a LLC de 1-2% al año.^{214,497} No obstante, seguimos sin conocer los mecanismos implicados en la progresión de la LBM^{hi} a LLC, así como los factores implicados en el desarrollo de ambas entidades. Asimismo, se desconoce si la LBM^{lo} se transforma también a LBM^{hi}, y en tal caso, cuál sería la tasa de transformación de LBM^{lo} a formas más avanzadas de la enfermedad, y que parámetros estarían asociados a un mayor riesgo de evolución de LBM^{lo} a LBM^{hi}, y de LBM^{hi} a LLC. Pese a este desconocimiento profundo, en los últimos años se han analizado de forma comparativa las características clínicas, citogenéticas y moleculares de ambas entidades, poniendo en evidencia la relación estrecha que existe entre la LBM y la LLC.

4.1. Características citogenéticas y moleculares de la LBM vs. LLC

La LBM (tanto LBM^{lo} como LBM^{hi}) presenta las mismas alteraciones citogenéticas que las descritas en la LLC, si bien, estas afectan a un porcentaje significativamente inferior de casos y/o de células tumorales. Así, en conjunto, cerca de 40-50% de las LBM^{lo} presentan alteraciones citogenéticas^{177,189,205} frente al 80% de las LBM^{hi} y el 80-85% de las LLC.^{184,214,361,362,367,498-500} Respecto a cada una de las alteraciones citogenéticas encontradas, cabe señalar que no existen diferencias sustanciales entre la LBM y la LLC en lo que respecta a aquellas anomalías que se han relacionado con buen pronóstico en la LLC, como la *del(13q14)(D13S25)* –26-44%, 29-58% y 35-55% de las LBM^{lo}, LBM^{hi} y LLC, respectivamente–.^{184,214,361,362,367,498-500} Por el contrario, estudios preliminares apuntan a que sí podrían existir diferencias en el porcentaje de casos afectados (y/o el número relativo de células alteradas) por otras alteraciones citogenéticas entre estas entidades. Así, desde la LBM^{lo} a la LLC, pasando por la LBM^{hi}, se observan porcentajes progresivamente crecientes de casos con trisomía 12 –4-7%, 12-21% y 16-23% de las LBM^{lo},

LBM^{hi} y LLC, respectivamente— y de células tumorales con esta alteración —50-59%, 80-87% y 77-84% de las LBM^{lo}, LBM^{hi} y LLC, respectivamente—;^{500,501} a su vez, las alteraciones genéticas asociadas a peor pronóstico están también claramente menos representadas en la LBM con respecto a la LLC, y dentro de la LBM su presencia está prácticamente restringida a la LBM^{hi} — i.e. la del(11q)(*ATM*) y la del(17p)(*TP53*) están presentes en 0-8% vs. 6-18% y en 0-4% vs. 2-16% de las LBM^{hi} y LLC, respectivamente—. ^{177,184,189,197,214,499–501}

Desde el punto de vista molecular, las células de la LBM muestran un repertorio de secuencias de BCR distintos del de la LLC, existiendo además diferencias notables dentro de la LBM, entre LBM^{lo} y LBM^{hi}.^{197,502} Así, mientras que la LBM^{lo} se caracteriza por un uso preferencial de algunas familias de BCR muy poco representadas en la LBM^{hi} y la LLC (e.g. *IGHV4-59/61* o *IGHV3-15*, entre otros), en la LBM^{lo} apenas se observa representación de la familia *IGHV1*, característica de un subgrupo de LLC con BCR estereotipado y de casos con BCR *IGHVnm*.^{197,500,502} A su vez, la frecuencia de BCR estereotipado es diferente entre LBM y LLC, incrementándose de manera progresiva desde la fase de LBM^{lo} (≈5%), hasta la LLC (≈35%), pasando por la LBM^{hi} (≈20%),⁵⁰² de manera análoga a lo anteriormente descrito para algunas alteraciones citogenéticas. Por el contrario, a pesar de que la frecuencia de BCR *IGHVnm* es diferente entre LBM y LLC (25% vs. 50% para LBM^{hi} y LLC, respectivamente), no parecen existir diferencias en este parámetro entre LBM^{lo} y LBM^{hi} (≈25% en ambas entidades).^{197,214,502} No obstante, cabe señalar que las características del BCR de la LBM^{hi} son muy similares a las de la LLC que se encuentran en las fases más iniciales de la enfermedad (i.e. Rai-0), lo que apoya aún más si cabe, la estrecha relación existente entre ambas entidades.^{197,214,502}

Respecto a los genes que se encuentran mutados de manera recurrente en LLC, se han descrito mutaciones en *NOTCH1* en un 3,2% de los casos de LBM^{hi} con respecto al 12% identificado en LLC, sin haberse descrito hasta la fecha mutaciones de *NOTCH1* en ningún caso de LBM^{lo}. Asimismo, para los genes *SF3B1* y *XPO1*, se han observado también resultados muy similares a los de *NOTCH1*: frecuencia de mutación de 1,5-10% en la LBM^{hi} vs. 9,7-21% en la LLC, y de 0% vs. 2,4-4% en LBM^{hi} vs. LLC, respectivamente.^{384,385,391,500} Por el contrario, la frecuencia de casos con mutación en el gen *MYD88* es aparentemente similar en LBM^{hi} y LLC.³⁹¹ En conjunto, estos hallazgos apoyan también la existencia de una estrecha relación molecular

entre LBM^{hi} y LLC. Sin embargo, seguimos sin tener pruebas definitivas (a nivel molecular) de la posible relación existente entre estas dos entidades y la LBM^{lo}.

4.2. Características clínicas de la LBM vs. LLC

Las diferencias existentes entre LBM y LLC, en cuanto al comportamiento clínico de ambas entidades, son muy significativas, ya que mientras que en la LLC podemos encontrar una gama muy variada de síntomas y signos clínicos de enfermedad, en la LBM no existe por definición ninguna manifestación clínica que pueda estar relacionada con la expansión de las células B clonales, debiendo alertar su aparición sobre la posibilidad de progresión a LLC. No obstante lo anterior, se ha referido un riesgo incrementado de infección grave (i.e. que conlleve ingreso hospitalario) y de padecer tumores no hematológicos (2 veces mayor) en sujetos que presentan LBM^{hi}, con respecto a lo observado en la población general.^{503,504} De esta manera, el riesgo de padecer infecciones graves y/o segundas neoplasias en sujetos con LBM^{hi} es muy similar al observado en la LLC.^{503,504} A pesar de ello, no se ha podido demostrar la existencia de diferencias significativas en la tasa de muerte de sujetos con LBM^{hi}, respecto a la población general (ajustada por edad, sexo y comorbilidades).^{505,506}

Hasta la fecha no existen estudios en los que se haya evaluado sistemáticamente la posible asociación existente entre LBM^{lo} y una mayor incidencia de infecciones; no obstante, datos previos de nuestro grupo apuntan a que esta incidencia podría estar también incrementada respecto a la de la población general, ya que los sujetos que presentan LBM^{lo} refieren con mayor frecuencia antecedentes personales de procesos infecciosos, especialmente de neumonía y gripe.⁵⁰⁷

Tanto el control de las infecciones, como la vigilancia antitumoral, son funciones dependientes de nuestro sistema inmune. En este sentido, desde hace décadas se conoce que los pacientes con LLC presentan un riesgo más elevado de padecer infecciones y segundas neoplasias que sujetos sanos de la misma edad,^{273,276} y que las infecciones constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en estos pacientes; la elevada morbi-mortalidad asociada a infecciones en la LLC estaría condicionada a su vez, por una alteración en la respuesta del sistema inmune, cuyos mecanismos patogénicos siguen siendo en gran medida desconocidos.^{273,274,276,281} En este contexto, cabe destacar que apenas se han llevado a cabo

estudios en los que se haya analizado el estado del sistema inmune en la LBM, tanto de bajo recuento como de alto recuento. Además, estos estudios se restringen a determinar la frecuencia de hipogammaglobulinemia en LBM^{hi} (29% de los casos), y a describir las alteraciones en el número de las distintas poblaciones de linfocitos T en la LBM^{lo} y la LBM^{hi},^{189,291,508} habiéndose encontrado una mayor frecuencia (vs. sujetos sanos no-LBM de la misma edad) de poblaciones linfoides T clonales en la SP de sujetos que presentan LBM^{lo}, especialmente dentro de la población T CD4⁺/CD8⁺, un hallazgo característico de procesos asociados a inmunosenescencia.^{291,509} Por otro lado, no se han identificado diferencias significativas en el número absoluto de ninguna población de linfocitos T en LBM^{hi} con respecto a la población general adulta de la misma edad, a diferencia de lo que ocurre en la LLC.²⁹¹

4.3. Progresión de LBM a LLC

Como hemos referido anteriormente en esta introducción, se ha descrito una tasa anual de progresión desde LBM^{hi} a LLC con necesidad de tratamiento de entre 1-2% de casos.^{187,214,510-512} Desde el punto de vista clínico, sería fundamental poder identificar qué LBM van a progresar a LLC y necesitar tratamiento citorreductor. Numerosos estudios han tratado de determinar qué características clínicas y biológicas de los sujetos con LBM^{hi} se asocian con un mayor riesgo de evolución a LLC;^{184,335,499,513-515} estos estudios han demostrado que, si bien la variable que mejor predice el riesgo de progresión es el número absoluto de linfocitos B clonales circulantes (de manera que se asocian a un riesgo de progresión bajo los casos con $<1,2 \times 10^9$ - $1,9 \times 10^9$ células/L y alto los casos con $>3,7 \times 10^9$ células/L)^{181,184,214,511,516}, existen otros parámetros biológicos, como el estado mutacional del BCR (*IGHV*^{nm} vs. *IGHV*^m), la expresión de CD38 en las células B clonales y la presencia y tipo de alteraciones citogenéticas, que parecen condicionar el TT, e incluso la SG de estos sujetos.^{184,506} En base a estos hallazgos, y debido a la gran similitud existente entre LBM^{hi} y los estadios más tempranos de la LLC (Rai-0/1 o Binet A), algunos investigadores han propuesto cambios en los criterios diagnósticos de LLC en lo que al punto de corte del número de células B clonales circulantes se refiere, que puedan reflejar mejor el distinto riesgo de progresión. Así, se ha referido que el riesgo de progresión clínica (asociada al desarrollo de síntomas con necesidad de tratamiento) aumentaría de forma significativa cuando

la expansión alcanza $\geq 10 \cdot 10^9$ linfocitos B clonales/L en SP, dentro de lo que hoy sería el estadio 0/A de Rai/Binet.^{184,505,517-519}

A pesar de todo lo anterior, y de la existencia de una clara relación entre LBM^{hi} y LLC, la posible asociación existente entre cualquiera de estas dos entidades y la LBM^{lo}, no resulta tan evidente. Hasta la fecha, solo existen dos estudios en los que se haya tratado de definir la tasa de progresión de LBM^{lo} a formas más avanzadas de la enfermedad (LBM^{hi} y LLC). En el primero de ellos, se reevaluaron 76 individuos con LBM^{lo} tras 3 años de seguimiento, comprobándose la persistencia del clon LBM^{lo} en el 90% de los casos en los que originalmente se había identificado la presencia de una población B clonal con fenotipo típico de LLC en SP. Por el contrario, en este mismo estudio, la tasa de persistencia de clones B con fenotipo no-LLC era aparentemente inferior (67%), hallazgo que no ha podido ser confirmado por otros autores, cuyos resultados muestran que dichos clones LBM^{lo} tipo no-LLC, no solo persistirían en el tiempo, sino que incluso aumentarían de tamaño.^{188,189} En el periodo de 3 años de seguimiento referido, ninguno de los casos estudiados, independientemente del fenotipo tumoral, progresó de LBM^{lo} a LBM^{hi} o LLC. En términos generales, la persistencia en el tiempo de los clones LBM^{lo} de tipo LLC podría indicar la persistencia también del estímulo responsable de la expansión B, la existencia de alteraciones genéticas asociadas a una mayor supervivencia de estas células y/o la posibilidad de que se trate de poblaciones minoritarias de células B normales de papel desconocido.¹⁸⁹ En este sentido, se ha sugerido que la presencia de clones LBM^{lo} podría explicarse por procesos de inmunosenescencia asociados al envejecimiento del sistema inmune, responsable del acumulo de poblaciones de linfocitos (oligo)clonales, en ocasiones como consecuencia de una respuesta a estimulación antigénica crónica.^{509,520-523} En cualquier caso, ninguno de los clones B que persistieron, mostró progresión a fases más avanzadas de la enfermedad (e.g. LBM^{hi} o LLC/SLPC-B).¹⁸⁹

En el otro estudio en el que se realizó seguimiento de sujetos con LBM^{lo}, se reevaluaron anualmente un total de 5 individuos con LBM^{lo} de tipo LLC durante una mediana de 7,6 años, demostrándose la persistencia de forma sistemática de las poblaciones B clonales en todos los sujetos analizados, sin que existiera una variación significativa en el tamaño del clon, ni progresión a formas más avanzadas de la enfermedad.⁵²⁴

Independientemente de lo anteriormente expuesto, para poder determinar el verdadero significado clínico y biológico de la LBM^{lo}, sería necesario monitorizar un número elevado de sujetos con LBM^{lo} durante largos periodos de tiempo, estudiando a ser posible, parámetros que pudieran aportar luz sobre los mecanismos que conducen a la progresión de la enfermedad en el caso de que esta ocurriese; solo así, podríamos ampliar nuestro conocimiento sobre los estadios iniciales de la enfermedad y los factores implicados en la ontogenia de la LLC.

4.4. Origen celular de la LBM y la LLC

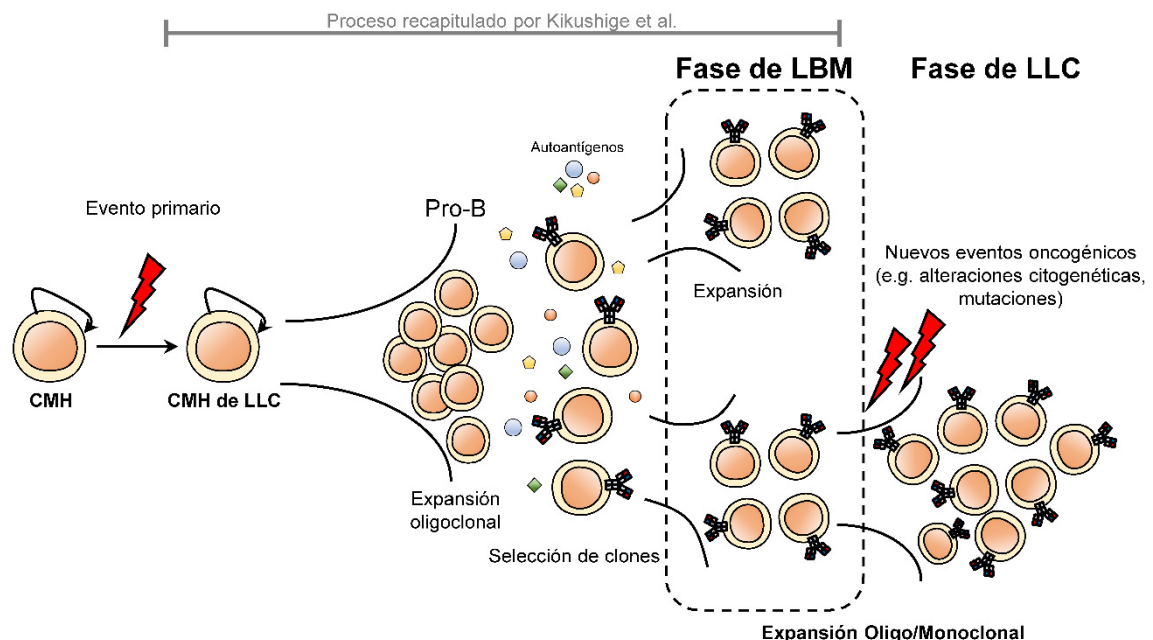
Uno de los mayores retos actuales de la investigación sobre LLC radica en la identificación inequívoca de la posible contrapartida celular normal de las células B tumorales, ya que su identificación y caracterización podría aportar información clave para entender mejor los mecanismos potencialmente implicados en el desarrollo y transformación maligna de esta enfermedad.

Los primeros estudios que trataron de profundizar en el conocimiento del origen celular de la LLC se basaron en datos morfológicos. Al tratarse de células pequeñas de SP, con una capacidad proliferativa limitada, inicialmente se asumió que se trataba de linfocitos relativamente inmaduros e inmunoincompetentes que se acumulaban como consecuencia de posibles desequilibrios en su supervivencia y capacidad de morir por apoptosis.⁵²⁵ Aunque en general, este concepto no es completamente erróneo, hoy sabemos que las células B tumorales de la LLC tienen una capacidad proliferativa relativamente más elevada en los órganos linfoides secundarios que en la SP.^{526–528} Además, los estudios inmunofenotípicos de las células B normales y de LLC, han demostrado que las células de esta enfermedad son linfocitos B (clonales) relativamente maduros y que, en alrededor de la mitad de los casos, han tenido contacto con Ag.^{400–402,404,406,436}

Pese a lo anteriormente referido, el grupo de Kikushige et al. demostró que como consecuencia del trasplante de CMH procedentes de pacientes con LLC, en MO de ratones inmunodeficientes, se observaba un incremento significativo del número de células que maduran a línea linfóide B, respecto a lo que ocurría en MO de animales no trasplantados.⁵²⁹ Además, estas CMH originaban con una mayor frecuencia poblaciones de linfocitos B oligoclonales, detectables ya desde las primeras etapas de la diferenciación B (células Pro-B), con

características inmunofenotípicas y moleculares similares a las observadas en los linfocitos B tumorales de la LLC (e.g. expresión de CD5 y CD23 de membrana, y uso preferencial de las familias VH1, VH3 y VH4 de *IGHV*). Globalmente, estos resultados sugieren la existencia de alteraciones genéticas y/o epigenéticas presentes ya en las CMH de pacientes con LLC, responsables de la aparición de las poblaciones oligoclonales de linfocitos B que, como consecuencia de su selección y expansión, podrían ser las responsables últimas del desarrollo de la LLC. No obstante, la expansión “maligna” de estas poblaciones clonales podría depender tanto de factores exógenos (como son el microambiente y/o estímulos antigénicos), como de factores intrínsecos a los linfocitos B clonales (como podrían ser las mutaciones y alteraciones citogenéticas adquiridas) que favorezcan la supervivencia y/o proliferación de las mismas (Figura 3).⁵²⁹ En relación con esta última hipótesis, el modelo propuesto por Kikushige et al.⁵²⁹ podría explicar la relación existente entre la LBM y la LLC como un proceso fundamentado en la selección natural, que por otra parte, ha sido propuesto también para explicar el origen de muchos otros tipos de tumores.^{530–533}

Figura 3 | Representación esquemática del modelo de ontogenia de la célula B tumoral de la LLC a partir de precusores hematopoyéticos de MO, según lo propuesto por Kikushige et al.⁵²⁹



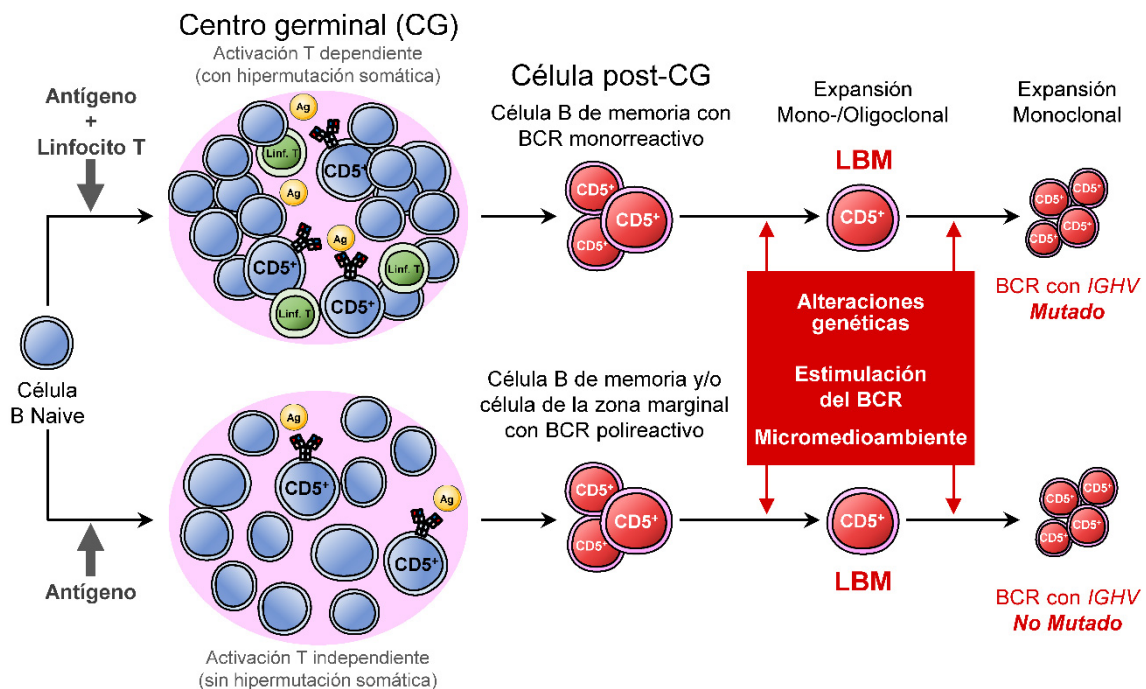
Modelo ontogénico hipotético de la LLC fundamentado en el modelo xenogénico de Kikushige et al. En este, la adquisición temprana de alteraciones genéticas en una CMH daría como resultado una hematopoyesis clonal, responsable de la aparición de poblaciones oligoclonales de linfocitos B. La selección de determinados clones estaría mediada por Ags del medioambiente, favoreciendo la expansión de estas poblaciones a través de la activación de su BCR. La adquisición posterior de nuevas alteraciones genéticas (eventos oncogénicos) conduciría a una selección y mayor expansión de alguna(s) de estas poblaciones, pudiendo llevar a la fase de LBM y posteriormente, a la LLC. [Esquema adaptado de Kikushige et al.⁵²⁹]

De acuerdo con este modelo, 0,7-3,4% de los pacientes con LLC presentan ≥ 2 clones de linfocitos B tumorales fenotípicamente diferentes, aumentando esta proporción hasta $\approx 20\%$ entre sujetos con LBM.^{177,500–502,534–537} Estos resultados apoyarían la existencia de una fase oligoclonal de la enfermedad asociada a la existencia de una selección y expansión de algunas de las poblaciones B oligoclonales, en la que intervendrían factores externos e internos a la propia célula tumoral. En este escenario, sería donde las células B clonales adquirirían alteraciones genéticas que, con la activación de determinadas vías de señalización y/o sobre la influencia de distintos factores (micro)medioambientales, conferirían una ventaja competitiva a algunas de dichas poblaciones (oligo)clonales, favoreciendo su expansión como clon dominante, en detrimento de los demás clones B.⁵²⁹ Este proceso de selección conduciría a la persistencia de un único (o unos pocos) clon(es) B dominante(s), tal como ocurre en la gran mayoría de las LLC.

Pese a que este modelo ontogénico podría explicar tanto la generación de clones LBM como su progresión, en general en él no se tiene en consideración que la LLC se presenta como un tumor de linfocitos B que expresan BCRs con secuencias tanto *IGHVnm* como *IGHVm*. Ambos subgrupos de pacientes muestran también repertorios *IGHV* diferentes, junto con una frecuencia de BCRs estereotipados significativamente distinta.^{398,480,538–540} Estas diferencias, han llevado a plantear otros modelos ontogénicos para la LLC, en los que podrían existir al menos dos orígenes celulares diferentes que explicarían, de manera independiente, la ontogenia de las LLC con BCR *IGHVnm* y de las LLC con BCR *IGHVm*.^{228,399,541} En tal caso, la contrapartida celular normal de las células tumorales de la LLC con BCR *IGHVnm* correspondería a células que no han sufrido HMS, y que por lo tanto serían (madurativamente) anteriores al paso por el CG (células B inmaduras o naive). Por el contrario, la contrapartida normal de las células tumorales de sujetos con BCR *IGHVm* correspondería a células que han sufrido HMS tras contacto con el Ag, en ausencia de CI; en este último supuesto, las células B clonales derivarían de linfocitos B de memoria, o bien de células de la zona marginal (ZM).^{376,542–544} Sin embargo, esta hipótesis que plantea un origen de la LLC en dos compartimentos celulares diferentes, no ha podido ser confirmada de manera definitiva, puesto que, a pesar de que existen diferencias en el repertorio BCR de las células *IGHVnm* e *IGHVm* de la LLC, ambos grupos presentan perfiles de expresión génica (PEG) prácticamente idénticos entre sí, y a la vez muy similares al de los linfocitos B de

memoria normales de SP, que ya han tenido contacto con Ag.^{542,543} En este sentido, los resultados de los estudios de PEG antes referidos, reducirían la posible contrapartida celular normal de la célula B tumoral de la LLC a linfocitos B de memoria y/o linfocitos de la ZM, entre los que es posible identificar tanto células con secuencias de BCR *IGHV*nm como *IGHV*m (Figura 4).⁵⁴⁵⁻⁵⁴⁷ En este contexto, tanto los linfocitos B de memoria como los linfocitos B de la ZM, pueden activarse a través de mecanismos independientes o dependientes de linfocitos T, lo que conllevaría la generación de células B que pueden haber sufrido o no fenómenos de HMS en su BCR (Figura 4).

Figura 4 | Representación esquemática del modelo de origen celular único para la LLC en el que pueden existir distintas vías de activación/señalización para clones B con BCR *IGHV*nm vs. BCR *IGHV*m.



Los linfocitos B naive podrían reconocer antígenos en el CG frente a los que responderían con la ayuda de los linfocitos T, sufriendo procesos de HMS y maduración de afinidad, sin CI, dando como resultado linfocitos B de memoria con secuencias *IGHV*m. Por el contrario, los linfocitos B naive podrían reconocer antígenos fuera del CG (o en el CG) en ausencia de colaboración por parte de los linfocitos T. En este caso, al no producirse HMS ni maduración de afinidad, los receptores de estas células carecen de mutaciones somáticas. Por lo tanto, la célula B de la LLC podría corresponder a una célula B de memoria originada a través de alguno de los dos mecanismos anteriormente descritos; alternativamente, podría corresponder a células de la ZM, con las que comparte múltiples características.

Pese a lo anteriormente expuesto, y aunque se ha descrito la existencia de linfocitos B de memoria que coexpresan los marcadores CD5⁺ y CD27⁺ en su superficie,⁵⁴⁸ en líneas generales, tanto los linfocitos B de memoria como los linfocitos B de la ZM muestran un fenotipo

distinto al fenotipo característico de la LLC, siendo habitualmente negativos para CD23 y CD5, mientras que expresan CD22 y sIg/CD79b de forma intensa, al contrario de lo que ocurre en la LLC; estos hallazgos irían también en contra de este segundo modelo hipotético de ontogenia de la LLC.^{376,542-544}

Por lo tanto, a pesar del esfuerzo realizado, hasta la fecha no se ha podido demostrar de manera fehaciente cuál es la contrapartida normal de la célula de la LLC, a la vez que seguimos sin conocer cómo se generan los clones LBM, ni cuáles son los factores implicados en su aparición

Hipótesis de trabajo y objetivos

La linfocitosis B monoclonal (LBM) constituye una entidad caracterizada por la presencia en individuos sanos –sin evidencia de síndrome linfoproliferativo crónico B (SLPC-B)–, de pequeñas poblaciones de linfocitos B clonales ($<5 \times 10^9/L$), que en la mayoría de los casos presentan un inmunofenotipo idéntico al de las células tumorales de la leucemia linfática crónica B (LLC).¹⁷¹ Esta entidad puede subclasificarse en función del tamaño de la población clonal identificada en dos categorías, dependiendo de si el número de células B clonales en sangre es menor o mayor a $0,5 \times 10^9/L$.^{179,180} a) LBM de bajo recuento (LBM^{lo}), caracterizada por la presencia de un número extremadamente pequeño de linfocitos B clonales circulantes, solo detectables en estudios poblacionales^{172,180,192} y b) LBM de alto recuento (LBM^{hi}), asociada habitualmente a una linfocitosis absoluta y considerada como la antesala de la LLC (es decir, una condición pre-leucémica), con una tasa de progresión a LLC con necesidad de tratamiento de un 1-2% al año.^{174,214,497,510} Hoy sabemos que la frecuencia de LBM^{lo} en la población general es muy elevada (hasta 14% de los adultos mayores de 40 años, cuando se emplean técnicas de citometría de flujo de alta sensibilidad), y que su porcentaje se incrementa de forma progresiva con la edad, llegando a afectar a casi la cuarta parte de los individuos mayores de 70 años, en nuestro entorno.¹⁷⁷

Actualmente existen múltiples evidencias que demuestran la existencia de una relación directa entre la LBM^{hi} y la LLC, como la ya referida tasa anual de progresión de LBM^{hi} a LLC, y el hallazgo de que prácticamente todas las LLC están precedidas por una LBM^{hi}.^{174,214,497} Por el contrario, pese a la elevada frecuencia de LBM^{lo} en la población general, seguimos sin conocer el significado clínico y biológico de la presencia de estos pequeños clones linfoides B circulantes –en la inmensa mayoría de los casos en nuestro entorno con fenotipo idéntico al de la LLC–, así como su relación con la LBM^{hi} y la LLC. Queda por tanto por aclarar: i) si la LBM^{lo} realmente representa la fase más temprana de la neoplasia, ii) dónde se producirían las primeras alteraciones que conducirían a la LLC (presumiblemente tras pasar por una etapa de MBL^{hi} intermedia), o iii) si por el contrario, la elevada prevalencia de LBM^{lo} en la población general se debe a que estas células B clonales representan la contrapartida celular normal de la LLC; en este último caso, los clones de tipo LBM^{lo} estarían constituidos por pequeños clones fisiológicos de linfocitos B, que aparecerían en respuesta a distintos estímulos de nuestro ambiente, siendo especialmente frecuentes en sujetos de edad avanzada. Abundando en esta última hipótesis,

algunos trabajos sugieren que las células B clonales de la LBM^{lo}, en realidad podrían ser el reflejo de un fenómeno de inmunosenescencia en respuesta a una estimulación antigénica crónica.^{189,509} En tal caso, inicialmente se produciría la emergencia de una población reactiva (oligo)clonal como consecuencia de la presencia de estímulos (auto)antigénicos comunes del micromedioambiente tisular en el que se generan dichos clones. Si este fuera el caso, la persistencia de cada una de las poblaciones B (oligo)clonales en el tiempo dependería directamente de la presencia del estímulo en el medio en el que este se encuentra, por lo que la eliminación del mismo podría suponer la desaparición de dichas poblaciones clonales, o parte de ellas. En el momento de iniciar el presente trabajo de tesis doctoral, no existían en la literatura referencias sobre i) la evolución a medio plazo (5-10 años) de los sujetos portadores de clones LBM^{lo}, ii) la estabilidad o persistencia de las poblaciones B clonales que estos presentan, o iii) los posibles cambios en sus características biológicas a lo largo del tiempo, que pudieran ayudarnos a comprender mejor la relación entre la LBM^{lo} y tanto la LBM^{hi} como la LLC.

Por otro lado, estudios preliminares de nuestro grupo habían sugerido ya la existencia de una alteración temprana en la distribución de poblaciones de linfocitos B normales en sujetos con LBM^{lo}.⁵⁴⁹ De las diversas alteraciones de la respuesta inmunológica descritas en la LLC, la hipogammaglobulinemia es posiblemente la alteración más frecuente y característica de esta enfermedad, contribuyendo a la elevada frecuencia de infecciones observada en pacientes con LLC.^{274,276} Recientemente, se ha visto además que sujetos con LBM^{hi} presentan una frecuencia de infecciones similar a la observada en la LLC, siendo los agentes etiológicos también los mismos en ambas entidades.⁵⁰³ Hasta la fecha, se desconocen cuáles son los mecanismos específicos que conducen a este estado de inmunodeficiencia, que parece existir desde fases relativamente tempranas, y en qué medida la afectación de la inmunidad es causa o consecuencia de la expansión de los linfocitos B clonales.

Considerando la hipótesis de que la LBM^{lo} podría suponer la fase más incipiente de la enfermedad leucémica, cabe preguntarse por el posible papel de una respuesta inmunológica alterada en la evolución de los clones de linfocitos B tipo LLC y de los sujetos portadores de una LBM^{lo}. Pese a que la respuesta mediada por anticuerpos es una de las alteraciones inmunes más frecuentes en la LBM^{hi} y en la LLC, hasta la fecha no se ha estudiado de forma sistemática si existe una alteración en la distribución de las distintas poblaciones linfoides B normales de SP

en la LBM^{lo} respecto a la LBM^{hi}/LLC; asimismo, tampoco se conoce si existen alteraciones significativas de otros compartimentos linfoides (por ejemplo, dentro de los linfocitos T) en LBM^{lo} en comparación con las fases más avanzadas de la enfermedad (i.e. LBM^{hi} y LLC).^{291,297}

De acuerdo con estos antecedentes, en el presente trabajo de tesis doctoral nos planteamos como **objetivo general**: evaluar a medio plazo, la evolución clínica y biológica de sujetos de la población general de Salamanca que presentan clones LBM^{lo} y determinar el estado de su sistema inmune, particularmente en lo que al compartimento de linfocitos B (residuales) normales se refiere, en comparación tanto con el de adultos sanos sin LBM, como con pacientes con LBM^{hi} y LLC. Con ello podríamos llegar a comprender mejor los mecanismos y componentes asociados con el estado de inmunodeficiencia característico de las formas avanzadas de la enfermedad, establecer el momento en el que se produce dicha alteración inmunológica, y determinar su impacto sobre el pronóstico de los sujetos con LBM^{lo}. Para alcanzar este objetivo general, nos planteamos los siguientes **tres objetivos específicos**:

1. Determinar la tasa de persistencia y la cinética de las poblaciones linfoides B clonales presentes en SP de sujetos con LBM^{lo}, con el fin de definir su tasa de progresión a medio plazo a LBM^{hi} y LLC, y su impacto sobre la supervivencia de sujetos portadores de LBM^{lo}.
2. Evaluar la distribución de diferentes compartimentos madurativos de linfocitos B normales en SP, junto a los niveles de Igs séricas y sus subclases, en sujetos con LBM^{lo}, respecto tanto a adultos sanos sin LBM como a pacientes con LBM^{hi} y LLC, para lograr identificar las posibles alteraciones más tempranas de la respuesta inmune presentes ya en esta entidad.
3. Investigar el estado de la respuesta humoral específica frente a patógenos comunes de nuestro medio en sujetos con LBM^{lo} (vs. adultos sin LBM y con LBM^{hi}, y LLC), haciendo especial hincapié en aquellos microorganismos que se han asociado con la ontogenia de procesos neoplásicos (e.g. virus crónicos latentes) o que constituyen los principales agentes etiológicos de los procesos infecciosos que padecen los pacientes con LBM^{hi} y LLC (e.g. *S.pneumoniae*).

Material, métodos y resultados

En esta sección de la memoria se describen los pacientes, los materiales, y los métodos empleados, así como los resultados obtenidos, en relación con cada uno de los objetivos planteados en este trabajo doctoral, mediante la inclusión de los artículos científicos originales publicados como consecuencia del trabajo realizado. Cada uno de los artículos está precedido de un breve resumen en castellano, con el objetivo de facilitar una rápida revisión del contenido de los mismos.

ARTÍCULO 1

“La linfocitosis B monoclonal de bajo recuento persiste tras 7 años de seguimiento y se asocia a menor supervivencia”

Criado I,¹ Rodríguez-Caballero A,¹ Gutiérrez ML,¹ Pedreira CE,² Alcoceba M,³ Nieto W,¹ Teodosio C,¹ Bárcena P,¹ Romero A,⁴ Fernández-Navarro P,⁵ González M,³ Almeida J,¹ Orfao A¹ y el Grupo de Atención Primaria de Salud de Salamanca para el Estudio de la Linfocitosis B Monoclonal.

¹Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, USAL-CSIC), Departamento de Medicina y Servicio de Citometría (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, IBSAL y CIBERONC, Salamanca, España.

²Programa de Ingeniería, Sistemas y Computación (PESC), COPPE, Universidad Federal Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

³Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBMCC, IBSAL, CIBERONC y Departamento de Enfermería y Fisioterapia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁴Centro de Atención Primaria de Salud Miguel Armijo, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, España.

⁵Centro de Atención Primaria de Salud de Ledesma, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, España.

Haematologica, marzo de 2018.

DOI: 10.3324/haematol.2017.183954.

La información suplementaria correspondiente a este manuscrito está disponible en formato electrónico en la página web de la revista, así como en el Anexo I y el CD-ROM, disponibles al final de la presente memoria de tesis doctoral.

Introducción. La linfocitosis B monoclonal de bajo recuento (LBM^{lo}) se define por la presencia de pequeños clones de linfocitos B circulantes en la sangre periférica (SP) de individuos aparentemente sanos de la población general, en ausencia de linfocitosis absoluta. En la gran mayoría de los casos, estos clones presentan un fenotipo idéntico al de las células tumorales de la leucemia linfática crónica B (LLC). A pesar de la elevada prevalencia de LBM^{lo} en la población general ($\approx 14\%$ en sujetos mayores de 40 años), hasta la fecha son muy escasos los estudios publicados en los que se haya realizado un seguimiento longitudinal de individuos con LBM^{lo} (y los que existen, incluyen series pequeñas de sujetos, o tienen un tiempo de seguimiento corto), por lo que en el momento actual se desconoce cuál es el verdadero significado biológico y clínico de esta entidad, y si los clones LBM^{lo} tipo LLC constituyen la contrapartida celular normal de la LLC, o si por el contrario, representan la fase más temprana de la enfermedad.

Objetivo. El objetivo de este trabajo se ha centrado en determinar, si las poblaciones linfoides B clonales identificadas en la sangre de sujetos con LBM^{lo} persisten en el tiempo, las posibles variaciones en su tamaño y características biológicas, así como la tasa de progresión a formas más avanzadas de la enfermedad y su posible impacto sobre la supervivencia de estos sujetos a medio plazo.

Material y Métodos. Entre diciembre de 2007 y noviembre de 2009 se habían identificado en un estudio previo, empleando citometría de flujo de alta sensibilidad basada en el marcaje de muestras de SP con paneles de anticuerpos monoclonales combinados en ≥ 8 colores, y el análisis sistemático de un mínimo de 5×10^6 leucocitos/tubo en un equipo FACSCanto II, 91 individuos que presentaban LBM^{lo}, a partir de una serie de 639 adultos sanos (14%) mayores de 40 años, procedentes de la provincia de Salamanca y representativos de dicha área geográfica en lo que se refiere a su distribución por edad, sexo y núcleo poblacional de procedencia. La mayoría de los sujetos que presentaban LBM^{lo} eran portadores de clones de tipo LLC (80/91; 88%). Estos individuos fueron reevaluados tras un seguimiento de al menos 5 años (mediana de 7 años), empleando de nuevo citometría de flujo de alta sensibilidad realizada sobre nuevas muestras de SP. El análisis de los datos de citometría se realizó con el programa informático INFINICYT (Cytognos, Salamanca, España). Además, se analizaron las alteraciones citogenéticas asociadas a LLC en células B clonales purificadas a partir de SP con el citómetro-

separador FACS Aria, mediante técnica de hibridación in situ fluorescente (iFISH) realizada en ambos momentos del estudio (momento 0 y a los 7 años de seguimiento). Tras finalizar el seguimiento, se recogió la información sobre el estado (vivo vs. muerto) de todos los individuos de la cohorte original, a partir de los datos disponibles en la base de datos INDEF (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Madrid, España). Los análisis estadísticos se realizaron mediante test convencionales, empleando los programas SPSS (versión 19.0; SPSS-IBM, Armonk, NY) y MATLAB R2015a (Mathworks, Natick, MA).

Resultados. Tras una mediana de seguimiento de 7 años (rango: 61-95 meses), se logró obtener muestras de SP para monitorizar la presencia de linfocitos B clonales en 65 de los 91 individuos LBM^o de la serie original (71%). En los 26 sujetos restantes de la cohorte original solo se pudo obtener información sobre su estado (vivo/muerto) al final del estudio, pero no pudo recogerse nueva muestra, por diferentes motivos: i) 12/26 (46%) sujetos murieron antes del quinto año de seguimiento; ii) 2/26 sujetos revocaron su permiso para continuar en el estudio; y iii) en 12/26 casos se perdió el seguimiento tras más de 5 años, por diferentes razones.

En el 100% de los casos reevaluados mediante citometría de flujo (65/65) se confirmó la persistencia de clones de linfocitos B en SP, con el mismo fenotipo del momento basal (54 individuos con fenotipo de tipo LLC y 11 con fenotipo de tipo no-LLC); en total se identificaron 86 clones diferentes (74/86 clones de tipo LLC y 12/86 clones de tipo no-LLC). El tamaño de las poblaciones B clonales aumentó significativamente (al menos se duplicó con respecto al momento basal) en 69% de los casos. Asociado a este incremento del tamaño clonal, se observó un aumento significativo del número de células circulantes de todas las poblaciones de linfocitos T y de células NK en los sujetos con LBM^o (vs. las cifras basales de los controles). Además, merece destacar que la frecuencia de alteraciones citogenéticas prácticamente se duplicó tras un periodo de seguimiento medio de 7 años (32% en el momento basal vs. 61% a los 7 años de seguimiento; $P=0.01$), siendo la del(13q14)(D13S25) la alteración citogenética más frecuentemente encontrada en ambos momentos de estudio. No obstante, pese al incremento del tamaño clonal y de la frecuencia de alteraciones genéticas en la mayoría de los casos, en el momento de cerrar el estudio solo un individuo había progresado (1/65; 1,5%) a una linfocitosis B monoclonal de alto recuento (LBM^{hi}). De los 65 casos que se siguieron durante más de 5 años, 8 habían muerto al cierre del estudio. El análisis de la supervivencia global realizado sobre el

total de muertes ocurridas en la serie original de casos con LBM^{lo} (n=21), mostró una supervivencia global significativamente disminuida entre los individuos que presentaban LBM^{lo} respecto a la de los donantes sanos no-LBM de la cohorte original (con una misma distribución por edad, sexo y área geográfica), siendo estas diferencias especialmente significativas entre las mujeres. Las principales causas de muerte en los individuos LBM^{lo} fueron: infecciones, tumores y enfermedades cardiovasculares; de ellas, las infecciones estaban especialmente sobrerrepresentadas como causa de muerte en sujetos con LBM^{lo} vs. controles no-LBM de su misma edad y sexo (21% vs. 1,4%; $P \leq 0.001$). Además, el análisis multivariante puso de manifiesto que la presencia de clones LBM^{lo} se asociaba de manera independiente a un mayor riesgo de muerte, junto con la edad avanzada, los tumores y las enfermedades cardiovasculares.

Conclusiones. Las poblaciones de linfocitos B clonales tipo LBM^{lo} persisten, y con relativa frecuencia aumentan de tamaño y adquieren nuevas alteraciones citogenéticas tras una mediana de seguimiento de 7 años; sin embargo, la tasa de progresión de LBM^{lo} a formas más avanzadas de esta entidad (i.e. LBM^{hi} o LLC) es, a medio plazo, prácticamente nula. Aun así, los sujetos que padecen LBM^{lo} muestran un mayor riesgo de muerte con respecto a donantes sanos sin LBM, asociándose con relativa frecuencia las muertes de estos sujetos a infecciones. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la LBM^{lo} pueda constituir una fase inicial de la LLC, y sugieren la existencia de una posible alteración de la respuesta inmunológica desde fases muy tempranas de la enfermedad. Serían necesarios estudios longitudinales más prolongados en el tiempo y con series más amplias de sujetos, para poder analizar en profundidad las posibles alteraciones en la respuesta inmunológica existentes ya en las fases tempranas de la LBM (en LBM^{lo}), y su papel en la evolución a formas más avanzadas de la enfermedad (LBM^{hi} y LLC).

EUROPEAN
HEMATOLOGY
ASSOCIATIONFerrata Storti
Foundation

Low-count monoclonal B-cell lymphocytosis persists after seven years of follow-up and is associated with a poorer outcome

Ignacio Criado,¹ Arancha Rodríguez-Caballero,¹ M. Laura Gutiérrez,¹ Carlos E. Pedreira,² Miguel Alcoceba,³ Wendy Nieto,¹ Cristina Teodosio,¹ Paloma Bárcena,¹ Alfonso Romero,⁴ Paulino Fernández-Navarro,⁵ Marcos González,³ Julia Almeida,^{1*} Alberto Orfao^{1*} and The Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL

¹Cancer Research Centre (IBMCC, USAL-CSIC), Department of Medicine and Cytometry Service (NUCLEUS), University of Salamanca, IBSAL and CIBERONC, Spain; ²Systems and Computing Department (PESC), COPPE, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil; ³Hematology Service, University Hospital of Salamanca, IBMCC, IBSAL, CIBERONC and Department of Nursery and Physiotherapy, University of Salamanca, Spain; ⁴Centro de Atención Primaria de Salud Miguel Armijo, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Spain and ⁵Centro de Atención Primaria de Salud de Ledesma, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Spain

*AO and JA contributed equally to this work.

Haematologica 2018

Volume 103(7):xxxx-xxxx

Correspondence:

orfao@usal.es

Received: November 3, 2017.

Accepted: March 15, 2018.

Pre-published: March 22, 2018.

doi:10.3324/haematol.2017.183954

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: www.haematologica.org/content/103/7/xxx

©2017 Ferrata Storti Foundation

Material published in Haematologica is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>.

Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>,

sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



ABSTRACT

Low-count monoclonal B-cell lymphocytosis is defined by the presence of very low numbers of circulating clonal B cells, usually phenotypically similar to chronic lymphocytic leukemia cells, whose biological and clinical significance remains elusive. Herein, we re-evaluated 65/91 low-count monoclonal B-cell lymphocytosis cases (54 chronic lymphocytic leukemia-like and 11 non-chronic lymphocytic leukemia-like) followed-up for a median of seven years, using high-sensitivity flow cytometry and interphase fluorescence *in situ* hybridization. Overall, the clone size significantly increased in 69% of low-count monoclonal B-cell lymphocytosis cases, but only one subject progressed to high-count monoclonal B-cell lymphocytosis. In parallel, the frequency of cytogenetic alterations increased over time (32% vs. 61% of cases, respectively). The absolute number of the major T cell and natural killer cell populations also increased, but only among chronic lymphocytic leukemia-like cases with increased clone size vs. age- and sex-matched controls. Although progression to chronic lymphocytic leukemia was not observed, the overall survival of low count monoclonal B-cell lymphocytosis individuals was significantly reduced vs. non-monoclonal B-cell lymphocytosis controls ($P=0.03$) plus the general population from the same region ($P\leq 0.001$), particularly among females ($P=0.01$); infection and cancer were the main causes of death in low count monoclonal B-cell lymphocytosis. In summary, despite the fact that mid-term progression from low-count monoclonal B-cell lymphocytosis to high-count monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia appears to be unlikely, these clones persist at increased numbers, usually carrying more genetic alterations, and might thus be a marker of an impaired immune system indirectly associated with a poorer outcome, particularly among females.

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in adults in the Western world, typically affecting older patients, particularly males, with a median age at diagnosis of 70 years (y) old.¹ It is characterized by the accumulation of mature B cells in peripheral blood (PB), bone marrow (BM) and also secondary lymphoid tissues, with a uniquely aberrant CD19⁺ CD20^{+/lo} CD5^{+/++} CD23⁺ sIgM^{+/+lo} phenotype and restricted immunoglobulin (Ig) light chain usage.^{2,3} Typically, CLL shows a heterogeneous clinical outcome; thus, whereas in some patients the disease remains stable and they will never require treatment, in around 70% of cases treatment is required and results in variable outcomes, from complete response and prolonged survival to refractory disease and death.³⁻⁵

Currently, it is well established that virtually every CLL case is preceded by monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) defined by smaller numbers of circulating PB clonal CLL-like B-cells (<5,000 clonal B-cells/ μ L) in the absence of any clinical symptoms or signs of disease.⁶ In 2010, MBL was further subdivided into low-count (MBL^{lo}) and high-count MBL (MBL^{hi}), depending on the number of PB clonal B cells (lower vs. higher than 0.5×10^9 /L, respectively).⁷ While MBL^{hi} has been reported to progress to overt CLL requiring treatment at a rate of 1–2% cases per year,^{8,9} no information is available at present regarding the ≥ 5 -year risk of progression of MBL^{lo} to MBL^{hi} and CLL.¹⁰

The detection of MBL^{lo} has become routinely feasible due to the use of highly sensitive flow cytometry (FCM) approaches for the screening of subjects from the general population who present normal blood cell counts. Of note, the prevalence of MBL^{lo} is significantly higher than that of MBL^{hi} and CLL, with a frequency that ranges between 3% and 14% of the general adult (≥ 40 y) population, depending on the sensitivity of the FCM technique used.¹¹ Independently of the method, it is well-established that the incidence of MBL^{lo} progressively increases with age, with a prevalence >20% among individuals of more than 70 years of age.¹² Whether MBL^{lo} represents the normal counterpart of CLL (e.g., some studies suggest that MBL^{lo} clones are more likely related to immunosenescence)¹³ or a very early stage of development of CLL, remains an open question. This is partially because, in contrast to MBL^{hi}, long-term follow-up studies in large series of MBL^{lo} cases have not been reported thus far, which limits our understanding of the biological and clinical significance of very low numbers of circulating CLL-like clones, as well as those factors and mechanisms involved in potential long-term progression of (conceivably) a minor proportion of all MBL^{lo} cases to MBL^{hi} and CLL; likewise, little information is available about the evolution of non CLL-like MBL. Such information is critical to a better understanding of the ontogenesis of CLL from the very early stages of the disease, and to better identify MBL patients with stable vs. progressive B-cell lymphocytosis who might benefit from a closer clinical follow-up.

Herein, we report on a cohort of 91 MBL^{lo} (CLL-like and non CLL-like) subjects identified in a population-based screening study and followed for a minimum of five years (median >seven years). Our primary goal was to determine the rate of medium-term progression of MBL^{lo} to MBL^{hi} and CLL, and to identify the most relevant clinical and biological characteristics of PB lymphocytes associated with progression.

Methods

Subjects and samples

The baseline study was conducted from December 2007 to October 2009, when PB samples from 639 healthy adult (≥ 40 y) volunteers (54% females/46% males) from the general population of the same geographical area (Salamanca, Northwest of Spain) were screened for the presence of small B-cell clones, using highly sensitive FCM.^{12,14} At inclusion, all subjects had normal PB cell counts and did not suffer from any hematological/immunological disease, as described elsewhere.^{1,6} In 91/639 subjects studied (14.2%), ≥ 1 PB clonal B-cell population was detected at recruitment; in the vast majority of them (80/91; 88%) clonal B cells were consistent with CLL-like MBL^{lo} (< 0.5×10^9 clonal B cells/L showing

a CLL-like phenotype), whereas the remaining 11 individuals (12%) were classified as non CLL-like MBL^{lo}.^{12,14} MBL^{lo} subjects were re-evaluated at a median time of seven years after recruitment (range: 61 to 95 months). All subjects gave their written informed consent at baseline for both the initial and the follow-up studies, and they filled out an epidemiological questionnaire with demographic and (self-reported) medical information, under the supervision of his/her primary care doctor.¹⁵ The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca (Spain).

Flow cytometry immunophenotypic studies

Overall, 1–4 mL of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)-anticoagulated PB was collected per case and follow-up time-point; subsequently it was processed and analyzed using previously reported highly sensitive FCM approaches^{12,14,16,17} (*Online Supplementary Methods* and *Online Supplementary Table S1*).

Interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH) studies

The most common CLL - i.e., del(13q14), trisomy 12, del(11q)(*ATM*) and del(17p)(*TP53*) - along with other B-cell chronic lymphoproliferative disorders (B-CLPD)-associated cytogenetic alterations were investigated by iFISH on fluorescence-activated cell sorting (FACS)-purified (sorted) single clonal B cells ($\geq 95\%$ purity), as previously described¹⁸ (*Online Supplementary Table S2*). A total of 31/91 PB samples studied at baseline and 56/65 at follow-up (year +7) were analyzed by iFISH; in 21 cases (18 CLL-like and three non CLL-like MBL^{lo}) paired samples were analyzed by iFISH at both baseline and year +7. The potential presence of del(13q14) was also tested in non-clonal B-cells from 5/7 MBL^{lo} cases found to have del(13q14)⁺ MBL cells.

Statistical analyses

All conventional statistical analyses (i.e., descriptive statistics, univariate analyses, including overall survival (OS) analysis, as well as multivariate analyses to predict the variables independently associated with a greater/lower risk of death), were performed with SPSS 19.0 software (SPSS-IBM, Armonk, NY, USA), using the tests, databases and statistical significance values detailed in *Online Supplementary Methods*. Appropriate tests were further used to objectively evaluate real changes in the size of the B-cell clones studied during follow-up (resampling bootstrap method)¹⁹ and to build a predictive linear regression model to estimate the time CLL-like MBL^{lo} clones might potentially take to progress to MBL^{hi} and CLL, using MATLAB R2015a (Mathworks, Natick, MA, USA) (*Online Supplementary Methods*).

Results

Follow-up of the MBL^{lo} cohort

From those 91 MBL^{lo} individuals identified in the screening study performed in the general population of Salamanca between 2007 and 2009,^{12,14} 65 (71% of MBL^{lo} cases from the original series; 29 males and 36 females; median age at baseline 70 (range: 43–84 years old)-; were re-evaluated after a median follow-up of seven years (range: 61 to 95 months) (Table 1). These 65 individuals were representative of the original MBL^{lo} cohort for all variables analyzed, except for a significantly lower age ($P=0.02$) vs. those 26 individuals that could not be followed - median age of 75 (range: 48–95 years)-. These later subjects could only be re-evaluated for their death vs. alive status at the end of the study because of: i) 12/26 (46%) died before the fifth year of follow-up; ii) 2 subjects

Table 1. Clinical and biological characteristics of MBL^{lo} subjects at baseline and after follow-up (year +7).

	All subjects (n=65)		CLL-like MBL ^{lo} subjects (n=54)		Non CLL-like MBL subjects (n=11)		P
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	
Follow-up time (months)	0	84 (61-95)	0	84 (61-95)	0	83 (63-87)	NA
Male/Female*	29/36 (45%/55%)		22/32 (41%/59%)		7/4 (64%/36%)		NA
Age, years	70 (43-84)	75 (49-91)	68 (43-84)	75 (49-91)	76 (58-81)	83 (65-88)	<0.01 ^{abc}
Leukocytosis (>10x10 ⁹ /L)*	0 (0%)	2 (3%)	0 (0%)	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	NS
Lymphocytosis (>4x10 ⁹ /L)*	0 (0%)	3 (5%)	0 (0%)	2 (4%)	0 (0%)	1 (9%)	NS
N. total T cells/μL	1261 (341-2428)	1448 (276-3753)	1290 (341-2428)	1508 (460-3753)	1111 (796-1965)	1206 (276-2907)	<0.01 ^{ab}
N. CD4 ⁺ T cells/μL	687 (253-1572)	840 (184-2045)	684 (253-1572)	898 (227-2045)	732 (351-1395)	629 (184-1995)	0.015 ^{ab}
N. CD8 ⁺ T cells/μL	449 (71-1154)	491 (66-1742)	446 (71-1154)	479 (96-1742)	453 (237-750)	617 (66-848)	<0.03 ^{ab}
N. CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T cells/μL	4.3 (0.19-38)	8.2 (1.1-147)	4.5 (0.55-37)	8.2 (1.3-147)	4.3 (0.19-27)	8.2 (1.1-29)	<0.02 ^{abc}
N. CD4 ⁺ /CD8 ⁻ T cells/μL	56 (8.1-254)	62 (1.9-407)	58 (8.0-214)	64 (1.9-338)	36 (11-254)	34 (8.1-406)	<0.05 ^{ab}
N. NK cells/μL	304 (76-1138)	373 (87-3415)	297 (76-1138)	373 (89-3415)	394 (150-848)	372 (178-937)	0.001 ^{ab}
N. total B cells/μL	133 (26-1173)	155 (22-1218)	132 (41-478)	150 (28-1218)	137 (26-1173)	190 (22-1207)	<0.01 ^{ab}
N. normal B cells/μL	119 (23-478)	116 (21-536)	126 (37-478)	140 (26-536)	72 (23-136)	45 (21-190)	0.08 ^b
N. clonal B cells/μL	0.99 (0.03-1101)	2.0 (0.05-1149)	0.75 (0.03-66)	1.7 (0.05-808)	56 (0.62-1101)	90 (1.3-1149)	<0.001 ^{ab}
Subjects with ≥2 MBL clones*	21 (32%)	22 (34%)	18 (33%)	19 (35%)	3 (27%)	3 (27%)	NS
Progression* (to MBL ^{hi})	NA	1 (2%)	NA	1 (2%)	NA	0 (0%)	NA
Deaths*	NA	8 (12%)	NA	7 (13%)	NA	1 (9%)	NA

CLL-like or non CLL-like with ≥1 B-cell clone with different phenotypes were classified depending on the phenotype of the larger clone. Results expressed as median (range) or *as number of cases (percentage). ^aBaseline *vs.* follow-up (year +7) for all cases. ^bBaseline *vs.* follow-up (year +7) for CLL-like MBL cases. ^cBaseline *vs.* follow-up (year +7) for non CLL-like MBL cases. CLL: chronic lymphocytic leukemia; MBL^{hi}: high-count monoclonal B-cell lymphocytosis; MBL^{lo}: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; N: number; NA: not applicable; NK: natural killer; NS: not statistically significantly different (*P*>0.05).

declined continuing their participation in the study; and iii) the remaining 12 cases were lost to follow-up after >5y from recruitment. Eight of 65 cases followed for >5y (12%) died afterward, making a total of 21 (26%) deaths among MBL^{lo} cases included in OS analyses.

In all 65 individuals who were evaluated after five years, ≥1 clonal B-cell population was reliably identified in PB at follow-up. In 22/65 (34%) cases ≥2 clones were detected (*vs.* 32% at baseline), resulting in a total of 86 MBL^{lo} clones detected (Table 1 and Table 2). All MBL^{lo} clones showed an identical phenotype at both time-points (Table 2). Thus, 74/86 B-cell clones (86%) showed a classical CLL-like phenotype and 12 (14%) were classified as non CLL-like MBL clones. At year +7, 35/74 CLL-like clones (47%) corre-

sponded to monoclonal cases and the remaining 39 (53%), to 19 subjects with bi(multi)clonal CLL-like MBL^{lo} (Table 2); in two subjects, CLL-like and non CLL-like clones coexisted. Of note, two individuals carrying two CLL-like B-cell clones became “monoclonal” while a second clone emerged in one monoclonal CLL-like MBL^{lo} case at seven years follow-up. In turn, non CLL-like clones (n=12) showed phenotypic profiles identical to those observed at baseline and comparable to those of different B-CLPD, as detailed in *Online Supplementary Table S3*.⁶

Clonal B-cell load in PB at re-evaluation (year +7).

Overall, a significant (*P*≤0.001) increase in the median size of MBL^{lo} clones was found at follow-up, both for CLL-

Table 2. Biological characteristics of MBL^{lo} clones at baseline and at follow-up (year +7).

	All clones (n=86)		CLL-like MBL ^{lo} clones (n=74)		Non CLL-like MBL clones (n=12)		P
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	
N. of clones from monoclonal/Bi(multi)clonal subjects*	44/42 (51%/49%)	42/44 (49%/51%)	36/38 (49%/51%)	35/39 (47%/53%)	8/4 (67%/33%)	7/5 (54%/46%)	NS
N. of clones that increased*	NA	59 (69%)	NA	51 (69%)	NA	8 (67%)	NA
N. clonal B cells/ μ L	0.06 (0.03-1101)	1.3 (0.05-1146)	0.46 (0.03-66)	0.85 (0.05-789)	37 (0.57-1101)	68 (1.3-1146)	<0.001 ^{ab}
% clonal B cells (from total B cells)	0.48% (0.02%-94%)	0.95% (0.02%-97%)	0.35% (0.02%-21%)	0.73% (0.02%-65%)	30% (0.46%-94%)	60% (1.4%-97%)	<0.03 ^{abc}

Results expressed as median (range) or as * number of cases (percentage). ^aBaseline vs. follow-up (year +7) for all cases. ^bBaseline vs. follow-up (year +7) for CLL-like MBL clones. ^cBaseline vs. follow-up (year +7) for non CLL-like MBL clones. CLL: chronic lymphocytic leukemia; MBL^{lo}: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; N: number; NA: not applicable; NS: not statistically significantly different ($P>0.05$).

like (\approx 2-fold median increase) and for non CLL-like MBL^{lo} clones (\approx 3-fold median increase) (Table 2 and Figure 1A,B). Such increased absolute number of clonal B-cells over time was associated with a significantly increased ($P\leq 0.001$) percentage of clonal B cells from all PB B cells (Table 2). In detail, most MBL^{lo} clones (59/86; 69%) showed significantly increased numbers at re-evaluation vs. baseline, while the remaining 27 B-cell clones persisted at similar (16%) or lower levels (15%); this behavior was very similar for CLL-like and non CLL-like clones (Table 2). Of note, 30/35 (86%) CLL-like clones from (mono)clonal cases increased in size at follow-up vs. only 21/39 (54%) clones from bi(multi)clonal cases ($P=0.004$). Interestingly, among non CLL-like clones, most marginal zone lymphoma-like clones increased (5/6; 83%), while the two mantle cell lymphoma-like B-cell clones decreased significantly in number (Online Supplementary Table S3).

Cytogenetic alterations of MBL^{lo} clonal B cells at baseline and follow-up

The overall frequency of CLL-like MBL^{lo} cases carrying CLL-associated cytogenetic alterations, for example del(13q14), trisomy 12, del(11q)(ATM) and del(17p)(TP53), at baseline was of 29% (7/24 cases tested). At recruitment del(13q14)(D13S25) was found in 56% \pm 34% cells from 6/20 cases evaluated (30%), the RB1 gene was additionally involved in 3 of them, and trisomy 12 was present in the remaining case (59% of cells), both as single alterations. After seven years of follow-up, the percentage of cytogenetic altered cases augmented to 62% of MBL^{lo} cases (31/50 cases, including 15 cases studied at baseline). Interestingly, all cytogenetic alterations observed at baseline also remained at follow-up; in addition, 4/15 (27%) individuals studied at both time-points further acquired del(13q14)(D13S25) (Online Supplementary Table S4). Overall, del(13q14)(D13S25) remained the most frequent alteration at follow-up (27/48; 56%), affecting 32 \pm 27% of CLL-like cells. Of note, in five cases in which clonal B cells showed del(13q14)(D13S25), non-clonal B cells were also studied for this alteration, and was found to be absent in all of them. RB1 gene involvement was identified in only 1/7 cases tested; furthermore, trisomy 12 was restricted to one patient who had the same abnormality at baseline (Table 3). Clonal B cells from one individual in whom del(17p)(TP53) was not investigated at baseline was found to carry this cytogenetic alteration in 10% of cells at follow-up. Alterations involving 14q32 were investigated

only at follow-up in a subset of 20 CLL-like MBL^{lo} cases, being found in five (20%) patients (Table 3).

Regarding non CLL-like clones, t(11;14)(q13-q32) was detected in 100% of clonal B cells from one of the two MCL-like cases studied, while del(7q32) was detected in 2/5 splenic marginal zone lymphoma (SMZL)-like cases (Table 3). None of the cases investigated showed t(14;18) (data not shown).

Distribution of normal residual T-, B- and NK-cell populations

The PB counts of total T cells and their CD4⁺CD8⁻, CD8⁺CD4⁻ and CD4⁻CD8^{+/lo} subsets, as well as NK cells and normal residual polyclonal B cells was significantly increased ($P<0.05$) in CLL-like MBL^{lo} at follow-up vs. baseline (Table 1). In contrast, among non CLL-like MBL cases, CD4⁺CD8⁺ T cells were the only lymphoid subset significantly increased ($P=0.02$) at the seven year follow-up. To rule out a potential age-related bias and further confirm these findings, we compared the number of PB normal lymphocyte subsets at seven years follow-up vs. a large series of non-MBL healthy donors matched per age and sex distribution to the CLL-like MBL^{lo} cases at seven years (Online Supplementary Table S5) and the same differences were found, ruling out an impact of sex or more advanced age on the increased PB residual lymphocyte counts. No significant correlation ($P>0.05$) was revealed between the absolute number of clonal B cells and any of the normal residual PB lymphocyte subsets analyzed (data not shown).

Clinical and biological characteristics of CLL-like MBL^{lo} at baseline vs. follow-up, according to the kinetics of the B-cell clone

Upon comparing CLL-like MBL^{lo} cases with increased vs. stable/decreased clonal B-cell numbers at seven years follow-up, the former had a similar male/female distribution, but they were significantly younger (median age: 68y vs. 78y; Table 4).

Strikingly, MBL^{lo} cases who showed larger CLL-like clone sizes over time also showed significantly higher ($P<0.05$) numbers of the distinct normal residual T-, B- and NK-cell subsets at follow-up (vs. baseline) (Table 4). Moreover, in these subjects a direct correlation was observed between the absolute number of clonal B cells and CD4⁺CD8⁻ T cells ($r^2=0.5$; $P=0.001$). In contrast, no significant ($P>0.05$) association was found between higher numbers of clonal CLL-like B cells in PB over time, and

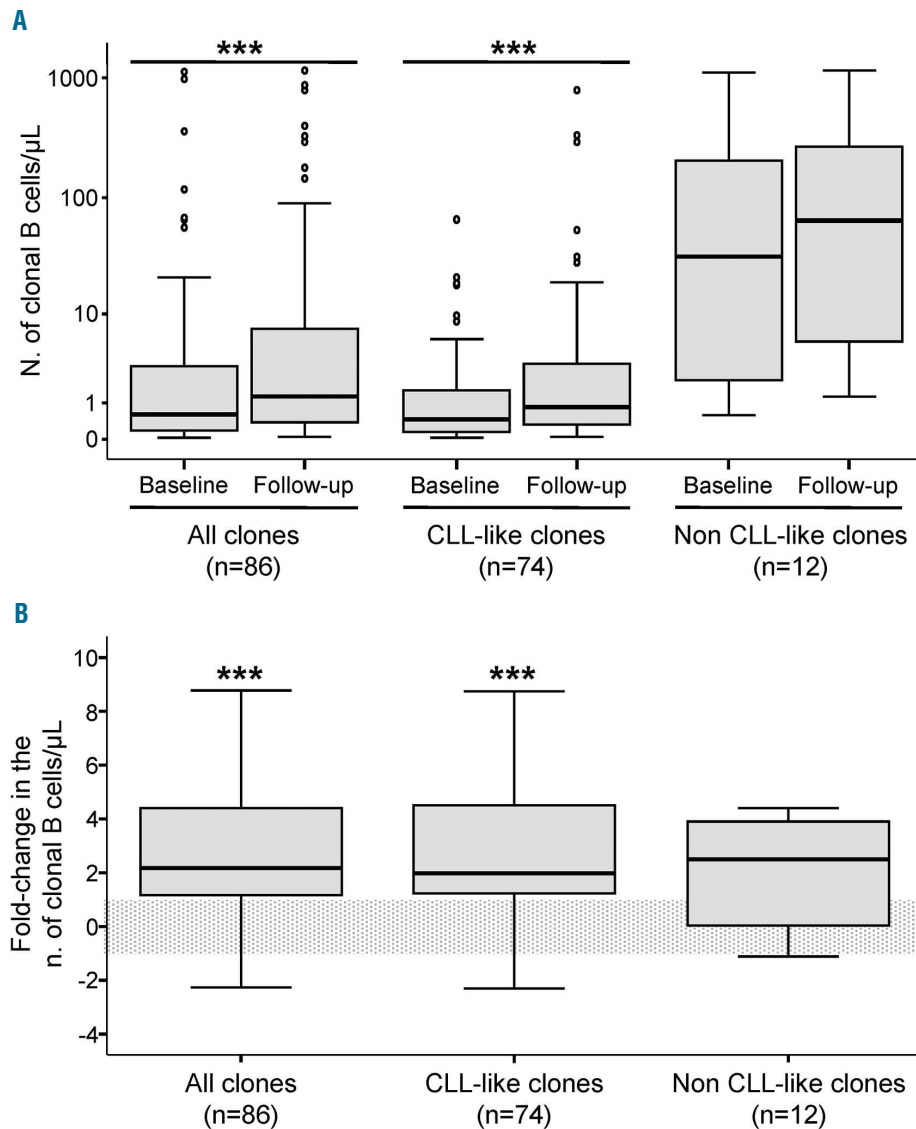


Figure 1. Changes in the number of clonal B cells during follow-up. Panel A shows the absolute number of PB clonal B cells/ μ L detected in MBL^{lo} individuals at baseline and at follow-up, according to the phenotype of the clonal population. Panel B represents the fold-change in the number of clonal B cells/ μ L from baseline, which is represented by the horizontal light gray box. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the lines in the middle correspond to median values (50th percentile) and vertical lines represent the highest and lowest values that are neither outliers nor extreme values, which are represented as single dots. ****P*-value <0.001. N: number; CLL: chronic lymphocytic leukemia.

an increased frequency of cytogenetic alterations. Interestingly, del(13q14) was the sole genetic alteration detected at the seven year follow-up within cases with stable/decreased CLL-like B-cell clones, while those cases with increased CLL-like B-cell clones at year +7 showed cytogenetic alterations other than del(13q14), e.g., trisomy 12 (1/40), del(17p)(*TP53*) (1/39) and t(14q32) (5/20 cases tested) (Table 4).

Clinical outcome of MBL^{lo} cases

Three subjects developed absolute lymphocytosis after seven years of follow-up (median: 5.3×10^9 lymphocytes/L; range: 4.1×10^9 - 5.9×10^9 /L) in the absence of signs of disease. Two had CLL-like B-cell clones carrying del(13q14), while the remaining case had a non CLL-like clone. In one of the two CLL-like MBL^{lo} cases, the size of the B-cell clone increased over the threshold for MBL^{hi} (>500 clonal B cells/ μ L), while the other two cases remained as MBL^{lo}. Remarkably, these three subjects displayed the highest increase in clone size at re-evaluation: this translated into a significantly lower (estimated) time to progression into CLL (median: 95y; range: 54-128y) according to the pre-

dictive mathematical model used. In turn, the estimated time to progression to CLL for the other MBL^{lo} individuals was far beyond a normal life expectancy (median: 54,767y; range: 54->63 million years).

Overall survival of MBL^{lo} vs. non-MBL individuals

At the end of the study (January 2017), the clinical records and epidemiological questionnaires from all individuals recruited at baseline were reviewed. During follow-up, 21/89 (24%) MBL^{lo} cases and 41/290 (14%) age- and sex-matched non-MBL^{lo} subjects from the original cohort had died (*P*=0.03). Though the median OS for the two groups had not been reached yet, a significantly shorter OS was observed for MBL^{lo} individuals vs. age- and sex-matched non-MBL controls from the same cohort and geographical area (10y OS rates of 76% vs. 86%, respectively; *P*=0.03) (Figure 2A,B). Moreover, MBL^{lo} subjects also showed a significantly shortened survival vs. age-matched individuals of the general population from the same geographical region (8.0% vs. 1.8% in the period 2015-2016, respectively; *P*<0.001) (Online Supplementary Figure S1). Interestingly, such differences in OS were at the

Table 3. Frequency of cases with CLL-associated cytogenetic alterations and percentage of cells affected by each genetic abnormality.

	All MBL ^{lo} cases		CLL-like MBL ^{lo} cases		Non CLL-like MBL ^{lo} cases		P
	Baseline (n=31)	Follow-up (n=56)	Baseline (n=24)	Follow-up # (n=50)	Baseline (n=7)	Follow-up (n=6)	
N. of cases with cytogenetic alterations (%)	10/31 (32%)	34/56 (61%)	7/24 (29%)	31/50 (62%)	3/7 (43%)	3/6 (50%)	0.01 ^{ab}
Chromosomal region							
del(13q14) (<i>D13S25</i>)	7/22 (32%)	28/54 (52%)	6/20 (30%)	27/48 (56%)	1/2 (50%)	1/6 (17%)	0.06 ^b
% altered cells	49±36%	31±27%	56±34%	32±27%	8%	7%	NA
del(13q14) (<i>RBI</i>)	3/15 (20%)	1/7 (14%)	3/15 (20%)	1/7 (14%)	NA	NA	NS
% altered cells	14±3%	47%	14±3%	47%			
Trisomy 12	2/21 (10%)	2/55 (3.6%)	1/19 (5.3%) [¥]	1/49 (2%) [¥]	1/2 (50%)	1/6 (17%)	NS
% altered cells	34±35%	45±35%	59%	70%	9%	20%	
del(11q) (<i>ATM</i>)	2/12 (17%)	1/54 (1.9%)	0/10 (0%)	0/48 (0%)	2/2 (100%)	1/6 (17%)	NS
% altered cells	39±44%	50%	NA	NA	39±44%	50%	
del(17p) (<i>TP53</i>)	1/10 (10%)	1/54 (1.9%)	0/8 (0%)	1/48 (2.1%)	1/2 (50%)	0/6 (0%)	NS
% altered cells	13%	10%	NA	10%	13%	NA	
t(14q32)*	0/5 (0%)	7/27 (26%)	NA	5/23 (22%)	0/4 (0%)	2/4 (50%)	NS
% altered cells	NA	33±30%		31±33%	NA	38±30%	
t(11;14)(q13-q32)	1/2 (50%)	NA	NA	NA	1/2 (50%)	NA	NA
% altered cells	100%				100%		
del(7q32)	0/1 (0%)	2/5 (40%)	NA	NA	0/1 (0%)	2/5 (40%)	NS
% altered cells	NA	20±2.1%			NA	20±2.1%	
3q27 (<i>BCL6</i>)	0/1 (0%)	0/5 (0%)	NA	NA	0/1 (0%)	0/5 (0%)	NS
% altered cells	NA	NA			NA	NA	
18q21 (<i>MALTI</i>)	0/2 (0%)	0/4 (0%)	NA	NA	0/2 (0%)	0/4 (0%)	NA
% altered cells	NA	NA			NA	NA	

Results expressed as number of cases (percentage of cases) and mean ± SD of percentage of cells affected by each specific genetic alteration. ^aBaseline vs. follow-up (year +7) for all cases. ^bBaseline vs. follow-up (year +7) for CLL-like MBL cases. ^cBaseline vs. follow-up (year +7) for non CLL-like MBL cases. [¥]2/50 individuals carried a clonal MBL^{lo} CLL-like population along with at least one MBL^{lo} non CLL-like clone. ^{*}The same case at baseline and follow-up. ^{*}Other than t(11;14). CLL: chronic lymphocytic leukemia; MBL^{lo}: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; N: number; NA: not applicable; NS: not statistically significantly different ($P>0.05$).

expense of a lower OS of CLL-like MBL^{lo} females, who showed a significantly ($P=0.01$) higher risk of death (hazard ratio (HR) of 2.5; 95% confidence interval (CI) of 1.2-5.4) than non-MBL females of the same age (Figure 2C,F). Infections (21%; mostly respiratory infections and sepsis), cancer (36%; all solid tumors except for an essential thrombocythemia) and cardiovascular diseases (29%; i.e., myocardial infarction and acute ischemic stroke) were the main causes of death among MBL^{lo} subjects. Overall, infections were overrepresented among the MBL^{lo} cohort vs. age- and sex-matched subjects from the general population of the same geographical area (21% vs. 1.4%, respectively; $P\leq 0.001$). In contrast, the proportion of deaths caused by tumors (36% vs. 26%, respectively; $P>0.05$) and by cardiovascular diseases (29% vs. 33%, respectively; $P>0.05$) were similar in both groups. In turn, no MBL^{lo} subjects died as a cause of non-infectious respiratory tract diseases or genitourinary diseases, diabetes, dementia or other nervous system disorders, which accounted for ≈30% of deaths in the age- and sex-matched general population cohort living in the same geographical area. In order to identify those variables independently associated with OS, a multivariate Cox regression analysis, including laboratory, epidemiological and medical information, was carried out. Advanced age- HR of 5.1; 95% CI: 1.5-17.5; $P=0.01$ -, co-existing cardiovascular diseases (HR: 2.7; 95% CI: 1.3-5.4; $P=0.01$), solid tumors (HR: 2.9; 95% CI: 1.3-6.5; $P=0.007$) and, to a lesser extent, the presence of MBL^{lo} clones (HR: 2.1, 95% CI: 0.97-

4.7; $P=0.06$), were independently associated with a shorter OS in the whole cohort (Table 5 and *Online Supplementary Table S6*).

Discussion

Several preceding studies have shown that virtually all CLL cases are preceded by MBL^{hi},^{8,20,21} in contrast, such a relationship has not been demonstrated for MBL^{lo} cases, its role as a preleukemic condition still remaining to be confirmed.^{9,21} In fact, there exist very few studies with short-term follow-up (i.e., ≤ 3 y) which have investigated the progression rate from MBL^{lo} to MBL^{hi} and CLL thus far.^{10,22,23} Hence, Fazi *et al.* showed persistent MBL^{lo} clones over time in 90% of CLL-like MBL^{lo} and only 67% of non CLL-like clones, after a median follow-up of ≈3y.¹⁰ Herein, we demonstrate the systematic persistence of both CLL-like and non CLL-like MBL^{lo} B-cell clones with an identical phenotype to baseline after seven years follow-up in 65/65 MBL^{lo} cases, confirming that MBL^{lo} is not a transient condition. Similarly, Matos *et al.* also found the persistence of B-cell clones in their limited series of CLL-like MBL^{lo} cases (n=5) after a median follow-up of ≈7y.²³ Interestingly, in 3/56 CLL-like MBL^{lo} cases, the number of clones identified at seven years follow-up changed, which might suggest the emergence of MBL^{lo} from an oligoclonal background that mirrors competition and natural selection among multiple coexisting clones.²⁴ Changes observed in the VDJ sequences of the expanded B cells from most of

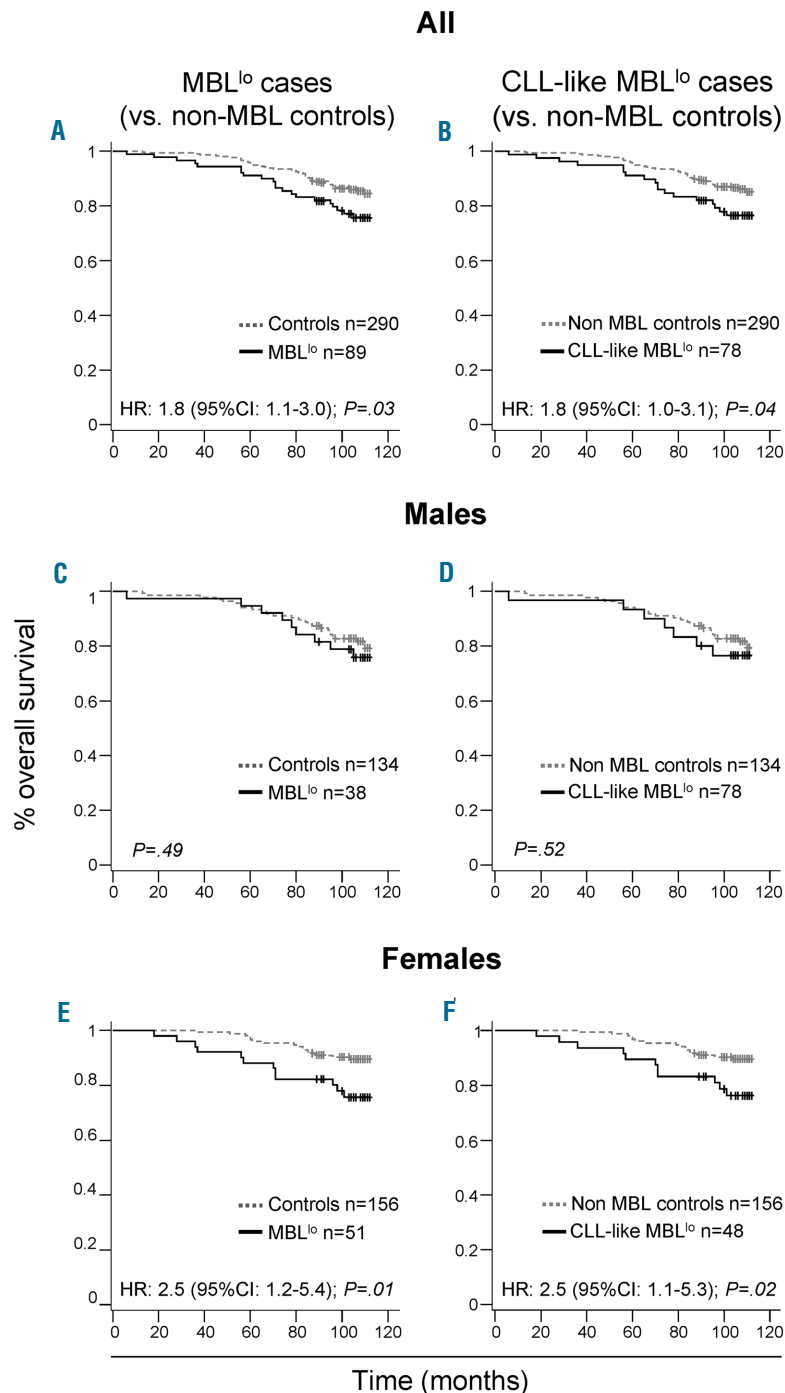


Figure 2. Overall survival from baseline (mortality rates) of MBL^{lo} individuals vs. age- and sex-matched non-MBL controls. Left column panels represent comparisons of overall survival curves from MBL^{lo} subjects (black) and age- and sex-matched non-MBL controls (dotted gray). The same comparison is depicted for all individuals (Panel A) and separately for males (Panel C) and females (Panel E). In the right column, overall survival curves comparing all MBL^{lo} subjects with a CLL-like phenotype vs. all age- and sex-matched non-MBL controls (Panel B). The same subjects distributed according to sex are shown in Panel D (males) and in Panel F (females). MBL^{lo}: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis.

these cases (*data not shown*), together with the progressively decreasing rate of oligoclonality from MBL^{lo} (12-19%) to MBL^{hi} (2.9-13%) and CLL (0.7-3.4%), would further support this hypothesis.^{9,12,25-27} The significance of such oligoclonal B-cell expansions in MBL^{lo} remains unknown, but might be the consequence of the early stages of altered oligoclonal immune responses against multiple antigens, in which a single clone had not yet emerged as dominant vs. the others, as might occur at the latter, e.g., CLL stage.

Most importantly, over two thirds of all CLL-like MBL^{lo} clones showed a significantly increased size in PB after seven years, while for non CLL-like clones more variable kinetics were observed, depending on the specific phenotype of clonal B-cells. Interestingly, we also observed a significant increase in the frequency of cytogenetic alter-

ations over time, evidencing that B-cell clones are not only dynamic in terms of clone size, but also regarding their capacity to acquire new cytogenetic alterations. Of note, del(13q14), which has been found to be a common mosaicism in the general population,^{28,29} was absent in non-clonal B cells from 5/5 cases investigated in which CLL-like clonal cells did carry this alteration, indicating that the emergence of this alteration in MBL^{lo} is specific for the clonal population. Altogether, these findings suggest that cytogenetic alterations are a relatively early, but not primary, event in the natural history of MBL/CLL, and might have a potential role in the progression of MBL^{lo} to MBL^{hi} and CLL.

The presence and type of cytogenetic lesions, the *IGHV* mutational status, or the presence of stereotyped receptors

Table 4. Clinical and biological characteristics of CLL-like MBL^b subjects at baseline and at follow-up (+7 years) according to the kinetics of the MBL clone in PB (decreased/stable vs. increased size).

	CLL-like MBL ^b subjects (n=56)		P
	Decrease/stable B-cell clones (n=9)	Increased B-cell clones (n=47)#	
Male/Female*	4/5 (44%/56%)	18/29 (38%/62%)	NS
Age at baseline, years	78 (55-84)	68 (43-81)	0.03
Monoclonal at follow-up*	5/9 (56%)	30/47 (64%)	NS
Leukocytosis (>10x10 ⁹ /L) at follow-up *	0 (0%)	2 (4%)	NS
Lymphocytosis (>4x10 ⁹ /L) at follow-up *	0 (0%)	2 (4%)	NS
N. total T cells/μL			
Baseline	1471 (1105-2035)	1285 (341-2428)	NS
follow-up	1406 (711-2313)	1520 (460-3753)	NS
P	NS	<0.01	
N. CD4 ⁺ T cells/μL			
Baseline	821 (461-1186)	448 (253-1572)	NS
follow-up	792 (295-1327)	908 (227-2045)	NS
P	NS	<0.01	
N. CD8 ⁺ T cells/μL			
Baseline	452 (374-900)	448 (72-1154)	NS
follow-up	491 (245-1469)	467 (96-1742)	NS
P	NS	0.02	
N. CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T cells/μL			
Baseline	4.3 (0.97-17)	4.6 (0.55-37)	NS
follow-up	4.7 (2.3-13)	8.6 (1.3-147)	0.03
P	NS	<0.001	
N. CD4 ⁺ /CD8 ⁻ T cells/μL			
Baseline	70 (8.2-214)	58 (8.0-190)	NS
follow-up	60 (7.2-272)	65 (1.9-338)	NS
P	NS	0.02	
N. total B cells/μL			
Baseline	110 (41-263)	139 (50-1066)	NS
follow-up	80 (29-390)	175 (28-1218)	0.02
P	NS	<0.01	
N. normal B cells/μL			
Baseline	94 (37-256)	122 (50-478)	NS
follow-up	79 (26-389)	140 (27-536)	NS
P	NS	0.03	
N. clonal B cells/μL			
Baseline	0.80 (0.13-23)	0.71 (0.03-66)	NS
follow-up	0.60 (0.05-3.2)	2.0 (0.10-808)	0.03
P	0.02	<0.001	
% clonal B cells			
Baseline	0.92 (0.10-20)	0.53 (0.02-21)	NS
follow-up	0.44 (0.04-10)	1.0 (0.06-66)	NS
P	0.05	<0.001	
N. NK cells/μL			
Baseline	304 (167-874)	292 (76-1138)	NS
follow-up	492 (310-1066)	361 (87-3415)	NS
P	NS	<0.01	
Cytogenetic alterations			
Baseline	0/4 (0%)	6/15 (38%)	NS
follow-up	6/9 (67%)	26/41 (63%)	NS
P	0.03	0.14	
del(13q14) (<i>DIS25</i>)			
Baseline	0/2 (0%)	5/13 (39%); 57±38%	NS
follow-up	6/9 (67%); 17±9%	21/39 (54%); 37±29%	NS

del(13q14) (<i>RBI</i>)			
Baseline	0/2 (0%)	3/13 (23%); 14±3.2%	NS
follow-up	NA	1/7 (14%); 47%	NA
Trisomy 12			
Baseline	0/3 (0%)	1/11 (9%); 59%	NS
follow-up	0/9 (0%)	1/40 (3%); 70%	NS
del(11q) (<i>ATM</i>)			
Baseline	0/2 (0%)	0/6 (0%)	NS
follow-up	0/9 (0%)	0/39 (0%)	NS
del(17p) (<i>TP53</i>)			
Baseline	0/2 (0%)	0/5 (0%)	NS
follow-up	0/9 (0%)	1/39 (3%); 10%	NS
t(14q32)			
Baseline	NA	NA	NA
follow-up	0/3 (0%)	5/20 (25%); 31±33%	NS

*2/56 individuals carried a clonal MBL^{lo} CLL-like population along with at least one MBL^{lo} non CLL-like clone. Results expressed as median (range) or as *number of cases (percentage). Cytogenetic alterations are expressed as percentage of cases and mean percentage of cells affected ± SD. P-values shown in the right column refer to comparisons between MBL^{lo} subjects who showed decreased/stable vs. increase clone sizes, while P-values shown in rows represent differences among subjects within each group at baseline and after seven years of follow-up. CLL: chronic lymphocytic leukemia; MBL^{lo}: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; N.: number; NA: not applicable; NK: natural killer; NS: not statistically significantly different ($P>0.05$).

are some of the most important prognostic factors in CLL, which also define the outcome of MBL^{hi} individuals; furthermore, it might identify a subset of cases in whom the presence of the B-cell clonal population influences OS.³⁰⁻³³ Unfortunately, in the present study, the mutational status and VDJ rearrangements were only assessed (both baseline and follow-up) in 8/65 MBL^{lo} individuals (*data not shown*), making it impossible to validate solid conclusions regarding the potential association with the risk for progression into MBL^{hi} and CLL. To the best of our knowledge, the frequency and impact on disease progression of recurrent mutations (i.e., *NOTCH1*, *SF3B1*, *MYD88*, etc.) found in CLL, and also in MBL^{hi}, to a lesser extent, has not been elucidated for MBL^{lo}.³⁴⁻³⁶ Therefore, analysis of these CLL-related mutations in MBL^{lo} cases might further contribute to an improvement in better delineating intrinsic tumor cell factors associated to disease progression.

In addition, the environment in which CLL-like MBL^{lo} clones develop might be influenced by chronic immune responses against e.g., host viruses, that might play a critical role in the expansion of clonal B cells, as recently suggested.³⁷ In line with this hypothesis, herein we also show that the expansion of CLL-like MBL^{lo} clones after seven years of follow-up (vs. baseline) is accompanied by a significant increase of all T-cell (but CD4⁺CD8⁺ cytotoxic T-cells) and NK-cell populations in PB.

Controversial results have been reported regarding PB T-cell numbers in MBL^{lo}. Hence, while te Raa *et al.* found normal CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts in PB of MBL^{hi},³⁸ other studies have demonstrated that around half of the MBL^{lo} individuals show ≥1 clonal/oligoclonal CD4⁺CD8⁺ T-cell population, with an overall increased frequency of clonal T-cell populations vs. age-matched individuals from the general population.^{10,39} However, the presence of clonal (CD4⁺CD8⁺ and other) T-cell expansions has also been described as a common event in older individuals, and has been associated with the ageing of the immune system.³⁹ In this respect, we demonstrate herein that changes in the number of circulating PB T-cell and NK-cell populations among our CLL-like MBL^{lo} subjects were not age-related, *via* a parallel analysis of a large group of 250 age- and sex-matched non-MBL controls (*Online Supplementary Table S5*). From a pathophysiological point of view, the increase

Table 5. Variables studied in the Cox regression multivariate analysis showing an independent impact ($P<0.1$) on OS for the whole MBL^{lo} plus non-MBL cohort.

Variables	HR (95%CI)	P
Whole cohort		
Cardiovascular disease	2.65 (1.30 - 5.41)	0.007
Age (<65y vs. ≥65y)	5.08 (1.48 - 17.49)	0.01
Solid tumor	2.86 (1.26 - 6.46)	0.01
MBL ^{lo} clones	2.14 (0.97 - 4.72)	0.06

CI: confidence interval; HR: hazard ratio; MBL^{lo}: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; N: number; OS: overall survival; PB: peripheral blood. The complete list of variables analyzed in the Cox regression model is provided in *Online Supplementary Table S6*.

in most PB T- and NK-cell populations could be associated with either a potentially protective or activating effect of these cellular components of the immune system (microenvironment) on the expanded clonal B-cells.^{40,41} Therefore, on one hand, increased numbers of (functionally impaired) T cells have been described in CLL^{38,42,43} while on the other hand, we have recently shown increased titers of plasma antibodies against CMV and EBV in MBL^{hi} and CLL patients vs. MBL^{lo} and non-MBL controls, despite their antibody (immune)deficient state.³⁷ Taken together, these latter findings might further support the existence of additional signals coming from immune cells other than clonal B cells, that could already contribute to the expansion of (cyto)genetically altered CLL-like clones at the earliest stages of disease, by promoting activation, proliferation and/or survival of specific B-cell clones.

A major goal of our study was to investigate the medium-term rate of progression of MBL^{lo} to MBL^{hi} and (potentially also) CLL. Overall, only one subject evolved from MBL^{lo} to MBL^{hi}, and none transformed to CLL, which would translate into a progression rate from MBL^{lo} to MBL^{hi} of 1.8% after seven years of follow-up. Despite the fact that the rate of progression of MBL^{lo} to MBL^{hi} and CLL appears to be extremely low, one of the most astonishing findings of our follow-up study was the significantly higher frequency of deaths among MBL^{lo} subjects, associated with a significant adverse impact on OS vs. both non-MBL controls, particularly among females, and the general pop-

ulation (of similar age and sex distribution) living in the same region in Spain. However, comparisons with the general population must be considered with care, since the conditions of this population might differ from that of non-MBL individuals recruited at the Primary Health Services. Multivariate analysis showed a borderline significant association between the presence of MBL^{lo} clones and a shorter survival. Despite this, the specific mechanisms responsible for the higher frequency of infections and deaths observed, particularly among women, are unknown, and further studies are required to validate and clarify these results. In this regard, controversial results have been reported on MBL^{hi} subjects in the literature. Thus, while Shanafelt *et al.* showed no differences in OS of MBL^{hi} vs. the general population,³³ Shim *et al.* pointed out a higher frequency of deaths in their MBL^{lo} cohort (4/11; 36%), albeit no statistically significant differences were found vs. non-MBL controls in the latter study, probably due to the small sample size.²² In addition, Fazi *et al.* also reported that 16/137 (12%) CLL-like MBL^{lo} subjects died before re-evaluation after a median time of three years, which is a high proportion of their whole cohort.¹⁰ However, in the aforementioned report no information about the age of the deceased subjects is provided, and therefore, if it is the case they were older (than those subjects remaining alive) such high mortality rates might have been expected. Even more strikingly is the overrepresentation of infections as causes of death in MBL^{lo} compared to that of our non-MBL cohort. Impaired immune responses and higher frequencies of infection have been recurrently reported in both MBL^{hi} and CLL,⁴⁴⁻⁴⁷ but so far very little information exists in MBL^{lo}, and such an association deserves further investigations. Several groups pointed out that the frequency of clonal hematopoiesis dramatically increases with age in the general population, especially among the elderly, in a similar way to the increased frequency of MBL^{lo}, reflecting a clear relationship between clonal hematopoiesis and a higher risk of death.^{48,49} Whether or not both phenomena are related to MBL^{lo} deserves future investigations.

In summary, we show herein that although MBL^{lo} is a

persistent and dynamic condition with a progressive acquisition of cytogenetic alterations, usually associated with an increased clone size and higher T- and NK-cell numbers in PB over time, progression of MBL^{lo} to MBL^{hi} and CLL is extremely rare in the medium-term. Despite this, the MBL^{lo} subjects analyzed herein, particularly women, showed a shortened OS associated with an increased risk of death, particularly due to infections, further supporting the notion that MBL^{lo} could be a marker of an impaired immune system, indirectly associated with a poorer outcome. Additional studies are necessary to confirm these findings and shed light onto the specific immune defects and microenvironmental factors involved in MBL^{lo}.

Funding

This work was supported by the RD06/0020/0035 and RD12/0036/0048 grants from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, (Madrid, Spain and FONDOS FEDER); CB16/12/00400 grant (CIBERONC, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, (Madrid, Spain and FONDOS FEDER); the FIS PI06/0824-FEDER, PS09/02430-FEDER, PI12/00905-FEDER, DTS15/00119-FEDER, PI16/00787-FEDER and PI17/00399-FEDER grants, from the Fondo de Investigación Sanitaria of Instituto de Salud Carlos III; the GRS206/A/08 grant, (Ayuda al Grupo GR37 de Excelencia, SAN/1778/2009) from the Gerencia Regional de Salud (Consejería de Educación and Consejería de Sanidad of Castilla y León, Valladolid, Spain) and the SA079U14 grant (Consejería de Educación and Consejería de Sanidad of Castilla y León, Valladolid, Spain). ML Gutiérrez is supported by grant PTA2014-09963-I from the Instituto de Salud Carlos III.

Acknowledgments

The authors would like to thank "The Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL" for their contribution to the study; a complete list of members is included in the Online Supplementary Information.

References

- Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *Am J Hematol.* 2016;91(3):330-340.
- Hallek M, Cheson BD, 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.
- Scarfo L, Ferreri AJM, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;104:169-182.
- Bachow SH, Lamanna N. Evolving strategies for the treatment of chronic lymphocytic leukemia in the upfront setting. *Curr Hematol Malig Rep.* 2016;11(1):61-70.
- Chiorazzi N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2012;2012:76-87.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon (France): IARC; 2017.
- Rawstron AC, Shanafelt T, Lanasa MC, et al. Different biology and clinical outcome according to the absolute numbers of clonal B-cells in monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(Suppl. 1):19-23.
- Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2008;359(6):575-583.
- Vardi A, Dagklis A, Scarfo L, et al. Immunogenetics shows that not all MBL are equal: the larger the clone, the more similar to CLL. *Blood.* 2013;121(22):4521-4528.
- Fazi C, Scarfo L, Pecciarini L, et al. General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood.* 2011;118(25):6618-6625.
- Shim YK, Middleton DC, Caporaso NE, et al. Prevalence of monoclonal B-cell lymphocytosis: a systematic review. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(Suppl. 1):10-18.
- Nieto WG, Almeida J, Romero 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.
- Scarfo L, Fazi C, Ghia P. MBL versus CLL: how important is the distinction? *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27(2):251-265.
- Nieto WG, Teodosio C, López A, et al. Non-CLL-like monoclonal B-Cell lymphocytosis in the general population: Prevalence and phenotypic/genetic characteristics. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(Suppl. 1):24-34.
- Casabonne D, Almeida J, Nieto WG, et al. Common infectious agents and monoclonal B-cell lymphocytosis: a cross-sectional epidemiological study among healthy adults. *PLoS One.* 2012;7(12):e52808.
- Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, et al. EuroFlow standardization of

- flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986–2010.
17. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31(10):2094–2103.
 18. Quijano S, López A, Rasillo A, et al. Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74(3):139–149.
 19. Efron B, Tibshirani R. Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals, and other measures of statistical accuracy. *Stat Sci*. 1986;1(1):54–77.
 20. Landgren O, Albitar M, Ma W, et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2009;360(7):659–667.
 21. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia*. 2010;24(3):512–520.
 22. Shim YK, Vogt RF, Middleton D, et al. Prevalence and natural history of monoclonal and polyclonal B-cell lymphocytosis in a residential adult population. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007;72(5):344–353.
 23. Matos DM, Furtado FM, Falcao RP. Monoclonal B-cell lymphocytosis in individuals from sporadic (non-familial) chronic lymphocytic leukemia families persists over time, but does not progress to chronic B-cell lymphoproliferative diseases. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(5):292–295.
 24. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306–313.
 25. Henriques A, Rodríguez-Caballero A, Nieto WG, et al. Combined patterns of IGHV repertoire and cytogenetic/molecular alterations in monoclonal B lymphocytosis versus chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One*. 2013;8(7):e67751.
 26. Sanchez M-L, Almeida J, Gonzalez D, et al. Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood*. 2003;102(8):2994–3002.
 27. Kern W, Bacher U, Schnittger S, et al. Flow cytometric identification of 76 patients with biclonal disease among 5523 patients with chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) and its genetic characterization. *Br J Haematol*. 2014;164(4):565–569.
 28. Jacobs KB, Yeager M, Zhou W, et al. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nat Genet*. 2012;44(6):651–658.
 29. Machiela MJ, Zhou W, Caporaso N, et al. Mosaic 13q14 deletions in peripheral leukocytes of non-hematologic cancer cases and healthy controls. *J Hum Genet*. 2016;61(5):411–418.
 30. Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, 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):3959–3963.
 31. Kern W, Bacher U, Haferlach C, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis is closely related to chronic lymphocytic leukaemia and may be better classified as early-stage CLL. *Br J Haematol*. 2012;157(1):86–96.
 32. Strati P, Shanafelt TD. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood*. 2015;126(4):454–462.
 33. Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, et al. Survival of patients with clinically identified monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) relative to the age- and sex-matched general population. *Leukemia*. 2012;26(2):373–376.
 34. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526(7574):525–530.
 35. Barrio S, Shanafelt TD, Ojha J, et al. Genomic characterization of high-count MBL cases indicates that early detection of driver mutations and subclonal expansion are predictors of adverse clinical outcome. *Leukemia*. 2017;31(1):170–176.
 36. Agathangelidis A, Ljungström V, Scarfò L, et al. Highly similar genomic landscapes in monoclonal B-cell lymphocytosis and ultra-stable chronic lymphocytic leukemia with low frequency of driver mutations. *Haematologica*. 2018 Feb 15. [Epub ahead of print].
 37. Criado I, Muñoz-Criado S, Rodríguez-Caballero A, et al. Host virus and pneumococcus-specific immune responses in high-count monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia: implications for disease progression. *Haematologica*. 2017;102(7):1238–1246.
 38. te Raa GD, Tonino SH, Remmerswaal EBM, et al. Chronic lymphocytic leukemia specific T-cell subset alterations are clone-size dependent and not present in monoclonal B lymphocytosis. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(11):2321–2325.
 39. Ghia P, Prato G, Stella S, Scielzo C, Geuna M, Caligaris-Cappio F. Age-dependent accumulation of monoclonal CD4+CD8+ double positive T lymphocytes in the peripheral blood of the elderly. *Br J Haematol*. 2007;139(5):780–790.
 40. Purroy N, Wu CJ. Coevolution of leukemia and host immune cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(4):a026740.
 41. Os A, Bürgler S, Ribes AP, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells are activated and proliferate in response to specific T helper cells. *Cell Rep*. 2013;4(3):566–77.
 42. Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, Gribben JG. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood*. 2012;120(7):1412–1421.
 43. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*. 2013;121(9):1612–1621.
 44. Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(1):145–153.
 45. Moreira J, Rabe KG, Cerhan JR, et al. Infectious complications among individuals with clinical monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): a cohort study of newly diagnosed cases compared to controls. *Leukemia*. 2013;27(1):136–141.
 46. Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood*. 2015;126(5):573–81.
 47. Solomon BM, Chaffee KG, Moreira J, et al. Risk of non-hematologic cancer in individuals with high-count monoclonal B-cell lymphocytosis. *Leukemia*. 2016;30(2):331–336.
 48. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488–2498.
 49. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477–2487.

ARTÍCULO 2

“La linfocitosis B monoclonal y la leucemia linfática crónica muestran diferentes perfiles de distribución de los linfocitos B normales residuales de sangre periférica”

Criado I,¹ Blanco E,¹ Rodríguez-Caballero A,¹ Alcoceba M,² Contreras T,³ Gutiérrez ML,¹ Romero A,⁴ Fernández-Navarro P,⁵ González M,² Solano F,⁶ Gómez C,⁶ Pérez-Andrés M,¹ van Dongen JJM,⁷ Almeida J,¹ Orfao A¹, el grupo EuroFlow PID y el Grupo de Atención Primaria de Salud de Salamanca para el Estudio de la Linfocitosis B Monoclonal.

¹Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, USAL-CSIC), Departamento de Medicina y Servicio de Citometría (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, IBSAL y CIBERONC, Salamanca, España.

²Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBMCC, IBSAL, CIBERONC y Departamento de Enfermería y Fisioterapia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

³Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

⁴Centro de Atención Primaria de Salud Miguel Armijo, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, España.

⁵Centro de Atención Primaria de Salud de Ledesma, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, España.

⁶Servicio de Hematología, Hospital Nuestra Señora del Prado, Talavera de la Reina, Sanidad de Castilla la Mancha (SESCAM), Castilla la Mancha, España.

⁷Departamento de Inmuno-Hematología y Transfusión sanguínea, Centro médico de la Universidad de Leiden, Universidad de Leiden, Leiden, Países Bajos.

Leukemia 2018, manuscrito aceptado para su publicación

La información suplementaria correspondiente a este manuscrito está disponible en formato electrónico en la página web de la revista, así como en el Anexo I y el CD-ROM, disponibles al final de la presente memoria de tesis doctoral.

Introducción. Tanto la linfocitosis B monoclonal (LBM) como la leucemia linfática crónica (LLC) se han asociado con una mayor frecuencia de infecciones, respecto a lo observado en individuos de la población general de la misma edad y sexo, siendo estas una de las principales causas de fallecimiento de los pacientes con LLC. Aunque no se conocen de forma precisa los mecanismos específicos que conducen a este estado de inmunodeficiencia, se han descrito numerosas alteraciones de la respuesta inmune en pacientes con LLC, siendo especialmente frecuente la presencia de hipogammaglobulinemia ($\approx 20-80\%$), lo cual sugiere la existencia de una alteración de la rama “humoral” de la respuesta inmune. A pesar de ello, hasta la fecha no se ha estudiado en detalle la distribución de las distintas poblaciones de linfocitos B normales residuales de sangre periférica (SP), ni en sujetos con LBM, ni en pacientes con LLC.

Objetivo. Analizar de forma comparativa la distribución de las distintas poblaciones de linfocitos B normales residuales circulantes en SP, así como los títulos de inmunoglobulina (Ig) y subclases de Ig plasmáticas, en sujetos con LBM y LLC, respecto a controles sanos, con el fin de identificar posibles alteraciones en la distribución de estas poblaciones celulares B y determinar su implicación en el estado de inmunodeficiencia característico de la enfermedad.

Material y Métodos. En total, se incluyeron en el estudio 110 individuos: 40 donantes sanos no-LBM, 27 LBM^o, 21 LBM^{hi} y 22 LLC en estadio 0 de Rai. De todos los sujetos se obtuvieron muestras de SP en las que se analizó mediante citometría de flujo de alta sensibilidad, la distribución de los principales estadios madurativos de los linfocitos B circulantes normales residuales (i.e. linfocitos B inmaduros, linfocitos B naive, linfocitos B de memoria y células plasmáticas), clasificándose además las poblaciones de linfocitos B de memoria y de células plasmáticas en función del isotipo y subclase de Ig expresada en su superficie celular. Los niveles plasmáticos de Ig y de sus subclases se determinaron mediante técnica de nefelometría/turbidimetría convencional.

Resultados. Los pacientes con LBM^{hi} y LLC presentaron una disminución muy acusada del número total de células B normales residuales en SP, fundamentalmente a expensas de un descenso del compartimento de células B pre-centro germinal (CG) (i.e. linfocitos B inmaduros y naive), mientras que el número de linfocitos B de memoria y de células plasmáticas no era significativamente diferente entre sujetos con LBM y LLC, con respecto a los controles sanos; de hecho, solo se observó una reducción estadísticamente significativa en el número de células

plasmáticas circulantes en sujetos con LBM^{hi} (vs. controles). Sin embargo, un análisis más detallado del compartimento de células B de memoria y de células plasmáticas, en función del isotipo y la subclase de Ig expresada en la membrana celular, mostró la existencia también de alteraciones significativas en la distribución de estas poblaciones B de SP, tanto en sujetos con LBM como en pacientes con LLC. Estas alteraciones consistían en: a) disminución del número de células plasmáticas IgM⁺ en LBM^{lo}; b) descenso de todas las poblaciones de células plasmáticas en LBM^{hi}; y c) disminución del número de células B de memoria y de células plasmáticas correspondientes a las subclases de Ig que se encuentran codificadas al final del gen *IGHC* (i.e. IgG2, IgG4 e IgA2) en LLC. Con respecto a los niveles plasmáticos de Ig solubles, los pacientes con LLC mostraron unos niveles (totales) de IgM e IgG significativamente disminuidos respecto al grupo control, que en el caso de la IgG era debido fundamentalmente al descenso de las subclases IgG2 e IgG4, codificadas al final del locus *IGHC*.

Conclusiones. La distribución de las distintas poblaciones de linfocitos B normales residuales de SP se encuentra ya alterada en la LBM respecto a donantes sanos, además de en la LLC, observándose en general un deterioro gradual de la respuesta inmune a medida que avanza la enfermedad, desde LBM^{lo} a LBM^{hi} y LLC. La reducción tan acentuada en el número de linfocitos B pre-CG observada en los sujetos con LBM^{hi} y LLC, podría ser reflejo de una ocupación (progresiva) por células B clonales de los nichos de médula ósea responsables de la producción de células B normales. Esto supondría una pérdida progresiva de la diversidad del repertorio BCR, necesaria para poder hacer frente a la gran diversidad de patógenos del medio, lo cual, a su vez, podría traducirse en una incapacidad de generar respuestas B frente a (algunos) patógenos. Esto podría explicar la disminución del número de células plasmáticas IgM⁺ observada ya en sujetos con LBM^{lo} (acentuada en la LBM^{hi} con el descenso de células plasmáticas de todos los isotipos), apoyando así la existencia de una alteración de la respuesta inmune desde las etapas más tempranas de la enfermedad. La aparente recuperación en el número de células plasmáticas de SP observado en pacientes con LLC respecto a la LBM^{hi}, podría explicarse, al menos en parte, como una consecuencia de la reactivación de la respuesta frente a antígenos comunes (dominantes) del micromedioambiente, como por ejemplo los derivados de virus latentes como citomegalovirus y/o el virus de Epstein-Barr, asociado al

correspondiente aumento global de las poblaciones de células plasmáticas y de linfocitos B de memoria

Residual normal B-cell profiles in monoclonal B-cell lymphocytosis versus chronic lymphocytic leukemia.

Ignacio Criado¹ • Elena Blanco¹ • Arancha Rodríguez-Caballero¹ • Miguel Alcoceba² • Teresa Contreras³ • María Laura Gutiérrez¹ • Alfonso Romero⁴ • Paulino Fernández-Navarro⁵ • Marcos González² • Fernando Solano⁶ • Carlos Gómez⁶ • Martín Pérez-Andrés¹ • Jacques J.M. van Dongen⁷ • Julia Almeida^{1*} • Alberto Orfao^{1*} • EuroFlow PID group and The Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common adult leukemia in Western countries, which is characterized by the accumulation of mature CD5⁺/CD20^{lo}/CD23⁺ clonal B-cells in peripheral blood (PB), bone marrow (BM) and other lymphoid tissues.¹ Currently, it is well-established that CLL is systematically preceded by a pre-leukemic stage, known as monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL);² MBL includes both low-count (MBL^{lo}) and high-count MBL (MBL^{hi}), depending on the number of PB clonal B-cells (<0.5x10⁹/L and ≥0.5x10⁹/L, respectively) detected,³ the former being a highly prevalent condition in adults (≈25% of individuals >70y).^{4,5}

The biological and clinical significance of CLL-like clonal B-cells in PB of otherwise healthy individuals (MBL^{lo}) has not been fully elucidated.⁶⁻⁸

Recently, we have reported a very low rate of transformation of MBL^{lo} to MBL^{hi}/CLL, after 7 years of follow-up.⁸ In contrast, we found a higher frequency of deaths in MBL^{lo} subjects vs. age- and sex-matched non-MBL healthy adults from the same geographical area; among the former subjects, infection was an overrepresented cause of death (21% vs. 2%, respectively).⁸ This is in line with previous studies showing a ≈3-fold increased risk of infection in both MBL^{hi} and CLL patients, in whom infections also represent a major cause of death.^{9,10} Altogether, the above findings suggest an impaired immune system and immunosurveillance, already at very early CLL stages. So far, several immunological defects of both the innate and adaptive compartments of the immune system have been reported in CLL, including hypogammaglobulinemia and an impaired T- and NK-cell function.¹⁰ However, the precise mechanisms that lead to this CLL-associated secondary immunodeficiency state still remain poorly understood, and little is known about the specific (pre-leukemic) stage of onset of the impaired immune response.

Since hypogammaglobulinemia is one of the most common and relevant alterations involved in the secondary immunodeficiency of most CLL patients, here we investigated the composition of the residual normal PB B-cell compartment in both MBL^{lo} and MBL^{hi} vs. early (Rai stage 0) CLL, to gain insight into the mechanisms involved in hypogammaglobulinemia in CLL, and the precise stage at which the first alterations occur.

Overall, 110 subjects –61 males (55%) and 49 females (45%); mean age: 72±11y– were prospectively enrolled in this study between January

These authors contributed equally:
Julia Almeida and Alberto Orfao

Alberto Orfao: orfao@usal.es

¹ Cancer Research Center (IBMCC, USAL-CSIC), Department of Medicine and Cytometry Service (NUCLEUS), University of Salamanca, CIBERONC and IBSAL, Salamanca, Spain.

²Hematology Service, University Hospital of Salamanca, IBMCC, CIBERONC, IBSAL and Department of Nursery and Physiotherapy, University of Salamanca, Salamanca, Spain.

³Biochemistry Service, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

⁴Centro de Atención Primaria de Salud Miguel Armijo, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, Spain.

⁵Centro de Atención Primaria de Salud de Ledesma, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, Spain.

⁶Hematology Service, Hospital Nuestra Señora del Prado, Talavera de la Reina, Toledo, Spain.

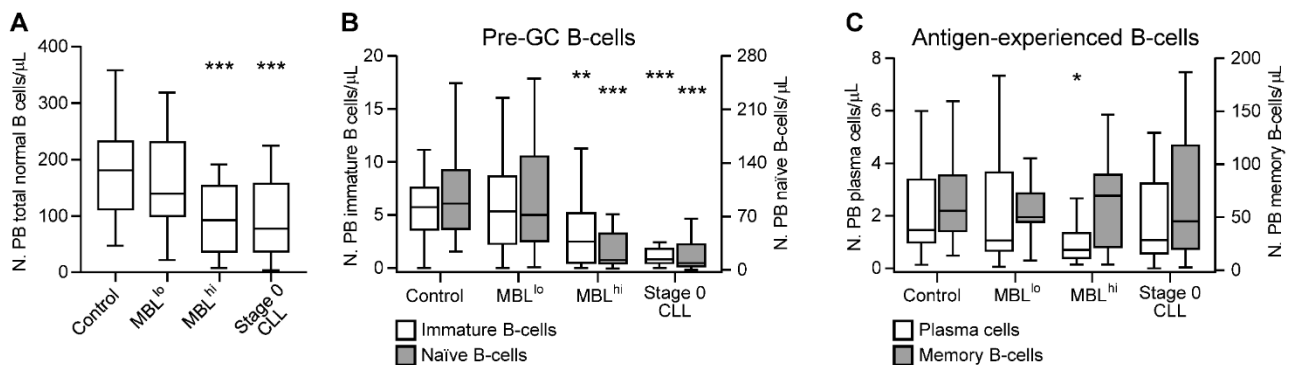
⁷Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

2015 and June 2017, with no seasonal differences in recruitment for the distinct groups analyzed. Subjects were classified into: controls (40 non-MBL^{lo} healthy adults), MBL^{lo} (n=27), MBL^{hi} (n=21) and CLL stage 0 (CLL-0) patients (n=22). Identification and characterization of residual normal PB B-cells and quantitation of immunoglobulin (Ig) levels was performed using high-sensitivity flowcytometry and nephelometry/turbidimetry, respectively. Inclusion criteria, flowcytometry protocols, panels and reagents, as well as the immunophenotypic criteria used for the identification of the different PB B-cell subsets, together with the clinical and biological characteristics of all individuals analyzed, are detailed in Supplementary Methods, Supplementary Tables 1-4 and Supplementary Figure 1.

Currently, it is well-established that during adulthood, PB MBC and PC counts (but neither PB immature nor naïve B-cell numbers) progressively decrease with age;¹² therefore, age alone could not explain the lower pre-GC B-cell counts here reported among MBL^{hi} and CLL-0 cases, also because a similar age distribution was observed among all groups analyzed (Supplementary Table 4; Supplementary Figure 2).

Conversely, the decreased numbers of pre-GC B-cells in PB of MBL^{hi} subjects suggests an impaired production of (newly-generated) B-cells in the BM, already at the earliest disease stages. This might be due to a decreased number of available BM niches, as soon as they are (progressively) occupied by CD5⁺ CLL-like clonal B-cells.

FIGURE 1



Distribution of normal residual B-cells and their major subsets in peripheral blood of MBL and CLL cases vs. non-MBL controls. Panel A shows the absolute number of residual normal B-cells. Panel B depicts the absolute number of pre-germinal center B-cells; white boxes represent immature B-cells (left Y-axis scale), while gray boxes represent naïve B-cells (right Y-axis scale). Panel C represents the absolute number of antigen-experienced B-cells; white boxes represent plasma cells (left Y-axis scale), while gray boxes represent memory B-cells (right Y-axis scale). In all panels, notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the lines in the middle correspond to median values and vertical lines represent the highest and lowest values that are neither outliers nor extreme values. * $P \leq 0.05$ vs. controls; ** $P \leq 0.01$ vs. controls; *** $P \leq 0.001$ vs. controls. MBL^{lo}: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; MBL^{hi}: high-count monoclonal B-cell lymphocytosis; CLL: chronic lymphocytic leukemia.

Overall, both MBL^{hi} and CLL-0 patients showed significantly reduced normal PB B-cell counts (Figure 1A), at the expense of pre-germinal center (GC) (immature and naïve) B-cells ($P \leq 0.001$; Figure 1B), while no significant differences were observed in MBL and CLL-0 vs. non-MBL controls regarding total PB memory B cells (MBC) (Figure 1C). In turn, the overall PB plasma cell (PC) compartment was significantly reduced (vs. controls) among MBL^{hi} subjects ($P = 0.002$), but not in CLL and MBL^{lo} cases (Figure 1C). These results confirm and extend on previous findings from our group showing that production and release of both immature and naïve B-cells into PB is already reduced in MBL.¹¹

Thus, previous studies have suggested that BM infiltration by CLL cells displaces other resident cell populations (e.g. normal B-cell precursors), and generates an impaired hematopoietic microenvironment.¹³ Interestingly, BM infiltration at early disease stages might preferentially affect the B-cell niches, since (by definition) no other cytopenias were observed in MBL and CLL-0 patients. BM analyses would then become crucial to better understand the underlying B-cell depletion mechanisms in these subjects; due to ethical reasons and the lack of medical indication for BM sampling in MBL, BM samples were not collected here.

However, if the above hypothesis holds true, decreased BM production of B-lymphocytes in the transition from MBL^{lo} to MBL^{hi} and CLL, would probably translate into a progressively narrower B-cell repertoire and progressively lower coverage of all required antigen specificities and thereby, to defective (new) B-cell responses against specific pathogens, as recently reported for pneumococcus.¹⁴ Further *IGH* repertoire analyses of purified normal pre-GC B-cell subsets from both MBL and CLL subjects are required to fully confirm this hypothesis.

Although total PB PC numbers were only reduced in MBL^{hi} and no statistical significant differences were observed in total MBC counts among the groups here studied, an altered distribution of B-cell subsets expressing distinct Ig-subclasses was observed among both antigen-experienced B-cell populations in MBL and CLL (Figure 2). Such altered distribution was progressively more marked from MBL^{lo} to MBL^{hi} and CLL-0. Thus, while in MBL^{lo} only slightly decreased IgM⁺ PC counts were found in PB (P=0.05; Supplementary Figure 2A), together with normal MBC and Ig levels (Figure 2C-D; Supplementary Figure 4 and Supplementary Figure 5), MBL^{hi} subjects showed reduced numbers of PC populations of all Ig-subclass (Figure 2A-B), except IgG3⁺ PC (Supplementary Figure 3B), together with lower numbers of IgG3⁺ and IgG4⁺ MBC (Supplementary Figure 4B and 4F). In turn, CLL-0 patients showed decreased IgM⁺, IgG2⁺, IgG4⁺ and IgA2⁺ PC counts (Supplementary Figure 3), and low IgG2⁺, IgG4⁺ and IgA2⁺ MBC numbers (Supplementary Figure 4), which translates into overall decreased numbers of PCs and MBCs expressing those Ig-subclasses encoded downstream in the *IGHC* gene (Figure 2B). Of note, no seasonal differences existed in recruitment among the four study groups, suggesting that differences in PC and MBC subset numbers were not influenced by seasonal changes.

Regarding plasma Ig titers, soluble IgM levels were significantly reduced in both MBL^{hi} (P=0.03) and CLL-0 (P=0.008) (Figure 2E); in addition, MBL^{hi} showed reduced IgG2 and IgG4 soluble levels (Supplementary Figure 5C-E) while CLL-0 patients displayed overall decreased plasma

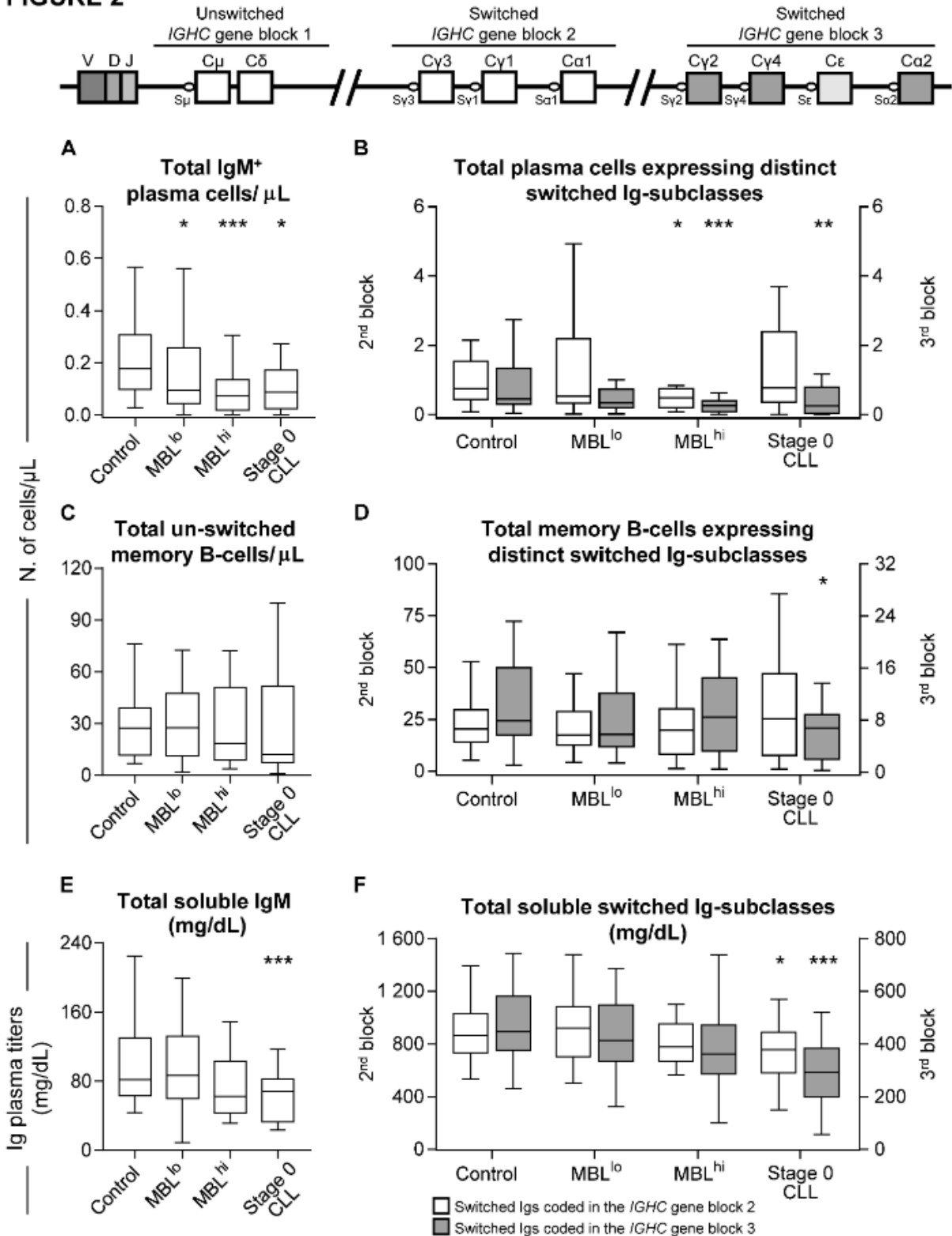
levels of all IgG-subclasses (P≤0.02), particularly also of those encoded downstream in the *IGHC* gene (i.e. IgG2, IgG4 and IgA21; P≤0.001; Figure 2F). Thus, the overall reduction in soluble IgG titers was mostly at the expense of Ig-subclasses coded downstream in the third block *IGHC* gene, mimicking the altered PC and MBC profiles described above for the same patients (Supplementary Figure 5).

Altogether, these results suggest that IgM⁺ PC responses are already hampered in MBL^{lo}, while they are associated with different patterns of alteration of other normal residual antigen-experienced B-cells in MBL^{hi} and CLL-0. Thus, while in MBL^{hi} almost all PC populations were already reduced, and only few (decreased IgG3⁺ and IgG4⁺ MBC) alterations were observed in the distribution of the distinct MBC subpopulations analyzed, a lower number of PC subsets, together with a greater number of MBC subsets were affected in CLL-0. Of note, MBC and PC expressing Ig-subclasses which are encoded downstream in the *IGHC* gene (i.e. IgG2⁺, IgG4⁺ and IgA2⁺) were the only antigen-experienced B-cell populations decreased in CLL (Figure 2A-D).

These later findings point out the existence of a progressive deterioration of B-cell responses driven by newly-encountered Ags from MBL^{lo} to MBL^{hi} and CLL-0. This is likely due to an impaired pre-GC B-cell production, that would lead to a progressively reduced B-cell repertoire, with decreased production of new Ag-experienced B-cells from MBL^{lo} to MBL^{hi} and CLL-0. This immunodeficiency state might explain the previously reported reactivation in CLL of B-cell responses against common pathogens, particularly host-viruses such as cytomegalovirus (CMV) and Epstein Barr-virus (EBV).¹⁴ The regeneration of PB PC numbers here reported between MBL^{hi} and CLL-0 could be thereby due to such reactivation of antibody responses against common (dominant) antigens, including new antibody responses against CMV and EBV;¹⁴ this is consistent with the apparent recovery of the number of PB PCs (and also MBCs) expressing Ig-subclasses which are coded upstream in the *IGHC* gene block (i.e. IgG3⁺, IgG1⁺ and IgA1⁺) as found here for CLL-0 patients.

These results would also support the higher frequency of infections driven by encapsulated

FIGURE 2



Distribution of PB antigen-experienced B-cell subsets expressing distinct Ig-subclasses and of soluble Ig-subclass plasma titers grouped according to the position they occupy in the *IGHC* gene blocks. Panels A and B represent the absolute number of IgM⁺ and switched plasma cells, respectively. In **panels C and D**, the absolute number of IgM⁺ un-switched memory B-cells and of switched memory B-cells are displayed, respectively. **Panels E and F** depict soluble IgM titers in plasma and the sum of the soluble levels of the different switched Ig-subclasses according to the distinct position that they occupy in the *IGHC* gene, respectively. In panels B, C and F, white boxes represent the sum of those Ig-subclasses encoded in the second *IGHC* gene block, while gray boxes represent the sum of those Ig-subclasses encoded in the third *IGHC* gene block. The relative position and order of the different gene segments of the *IGHC* gene that encode for the different Ig-subclasses are depicted in the top of the figure. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the lines in the middle correspond to median values and vertical lines represent the highest and lowest values that are neither outliers nor extreme values; **P*≤0.05 vs. controls; ***P*≤0.01 vs. controls; ****P*≤0.001 vs. controls. MBL^{lo}: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; MBL^{hi}: high-count monoclonal B-cell lymphocytosis; CLL: chronic lymphocytic leukemia.

bacteria in MBL and CLL patients, since IgG2 is the main actor in the humoral defense against polysaccharide antigens and it was significantly reduced in both MBL^{hi} and CLL.¹⁵ Further longitudinal long-term follow-up studies in larger series of newly-diagnosed/untreated MBL and CLL patients, including functional antigen-specific PC and MBC in vitro assays, are necessary to confirm this hypothesis.

Acknowledgements This work was supported by the RD06/0020/0035 and RD12/0036/0048 grants from *Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer* (RTICC), *Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad*, (Madrid, Spain and FONDOS FEDER); CB16/12/00400 and CB16/12/00233 grants, CIBERONC, *Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad*, (Madrid, Spain and FONDOS FEDER); the FIS PI06/0824-FEDER, PS09/02430-FEDER, PI12/00905-FEDER, DTS15/00119-FEDER and PI17/00399-FEDER grants, from the *Fondo de Investigación Sanitaria of Instituto de Salud Carlos III*; the GRS206/A/08 grant, (*Ayuda al Grupo GR37 de Excelencia, SAN/1778/2009*) from the *Gerencia Regional de Salud, (Consejería de Educación and Consejería de Sanidad of Castilla y León, Valladolid, Spain)*. ML Gutiérrez is supported by grant PTA2014-09963-I from the *Instituto de Salud Carlos III* and A Rodríguez-Caballero is supported by grant CB16/12/00400, *Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad*.

The authors would like to thank the *Spanish National DNA Bank (Banco Nacional de ADN Carlos III, University of Salamanca)* and all the members of *The Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL*, here listed (alphabetical order): Alonso Martín, María Monserrat (C.S. Fuentes de Oñoro); Asensio Oliva, María Carmen (C.S. Santa Marta de Tormes), Báñez Hernández, Pilar (C.S. Garrido Sur); Cabo Sastre, Luis (C.S. Garrido Sur); Carreño Luengo, María Teresa (C.S. Garrido Sur); Casado Romo, José María (C.S. Alba de Tormes); Cubino Luis, Rocio (C.S. Universidad-Centro); De Vega Parra, José (C.S. Peñaranda); Franco Esteban, Eloy (C.S. Pizarrales-Vidal); García García, María Concepción (C.S. Guijuelo); García Rodríguez, Bernardo Lucio (C.S. Pizarrales-Vidal); Garzón Martín, Agustín (C.S. Universidad-Centro); Goenaga Andrés, Rosario (C.S. Ledesma); Gómez Cabrera, Rosalía (C.S. Miguel Armijo); Gómez Sánchez, Francisco (C.S. Periurbana Norte); González Moreno, Josefa (C.S. Béjar); González Vicente, Ángel Carlos (C.S. Linares); Guarido Mateos, José Manuel (C.S. Vitigudino); Hernández Sánchez, María Jesús (C.S. Vitigudino); Herraes Martín, Ricardo (C.S. La Alberca); Herrero Sánchez, Amparo (C.S. Fuentes de Oñoro); Jiménez Ruano, María Josefa (C.S. Garrido Norte); Jimeno Cascón, Teresa Basa (C.S. Periurbana Sur); Macías Kuhn, Francisco (C.S. Ledesma); Mateos Rubio, Pablo (C.S. Ledesma); Márquez Velasco, María Salud (C.S. Sancti Spiritus); Merino Palazuelo, Miguel (C.S. Garrido Sur); Miguel Lozano, Rubén (C.S. Garrido Norte); Montero Luengo, Juan (C.S. San Juan); Muriel Díaz, María Paz (C.S. Miguel Armijo); Pablos Regueiro, Araceli (C.S. Lumbrales); Pascual Martín, J. Antonio (C.S. Fuentes de Oñoro); Pastor Alcalá, Luis (C.S. Vitigudino); Pedraza García, Jesús (C.S. Lumbrales); Pérez Díaz, Manuel (C.S. Pizarrales-Vidal); Pérez García, Manuel

(C.S. Alba de Tormes); Prieto Gutiérrez, María Teresa (C.S. Peñaranda); Ramos Arranz, Manuel (C.S. Ledesma); Ramos Mongue, Aurora Esther (C.S. Béjar); Rodríguez Medina, Ana María (C.S. Alba de Tormes); Rodríguez Vegas, Margarita (C.S. Periurbana Sur); Romo Cortina, Javier (C.S. Elena Ginel Díez); Elena Roselló, Carmen (C.S. Villoria); Sánchez Alonso, Begoña (C.S. Pizarrales-Vidal); Sánchez Bazo, Begoña (C.S. Periurbana Norte); Sánchez White, Nicolás (C.S. Béjar); Sandín Pérez, Rafael (C.S. San José); Sanz Santa-Cruz; Fernando (C.S. Capuchinos); Soto Jiménez, Francisco (C.S. Linares); Velasco Marcos, María Auxiliadora (C.S. Elena Ginel Díez); Vicente López, Horacio Marcos (C.S. Aldeadávila de la Ribera); Vicente Santos, M. Sebastián (C.S. Aldeadávila de la Ribera).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no competing financial interests or any other conflict of interest.

Open access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- 1 Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *Am J Hematol* 2016; **91**: 330–340.
- 2 Landgren O, Albitar M, Ma W, Abbasi F, Hayes RB, Ghia P *et al*. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2009; **360**: 659–667.
- 3 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *et al*. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. IARC: Lyon (France), 2017.
- 4 Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, Lopez A, Henriques AF *et al*. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 2009; **114**: 33–37.
- 5 Almeida J, Nieto WG, Teodosio C, Pedreira

- CE, Lopez A, Fernandez-Navarro P *et al.* CLL-like B-lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults. *Leukemia*. 2011; **25**: 718–722.
- 6 Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia* 2010; **24**: 512–20.
- 7 Fazi C, Scarfò L, Pecciarini L, Cottini F, Dagklis A, Janus A *et al.* General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood* 2011; **118**: 6618–6625.
- 8 Criado I, Rodriguez-Caballero A, Gutierrez ML, Pedreira CE, Alcoceba M, Nieto W *et al.* Low-count monoclonal B-cell lymphocytosis persists after 7 years of follow-up and is associated with a poorer outcome. *Haematologica* 2018; e-pub ahead of print 22 March 2018; doi: 10.3324/haematol.2017.183954.
- 9 Moreira J, Rabe KG, Cerhan JR, Kay NE, Wilson JW, Call TG *et al.* Infectious complications among individuals with clinical monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): a cohort study of newly diagnosed cases compared to controls. *Leukemia* 2013; **27**: 136–141.
- 10 Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood* 2015; **126**: 573–581.
- 11 Hauswirth AW, Almeida J, Nieto WG, Teodosio C, Rodriguez-Caballero A, Romero A *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) with normal lymphocyte counts is associated with decreased numbers of normal circulating B-cell subsets. *Am J Hematol* 2012; **87**: 721–724.
- 12 Blanco E, Perez-Andres M, Arriba-Mendez S, Contreras-Sanfeliciano T, Criado I, Pelak O *et al.* Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 2018; e-pub ahead of print 2 March 2018; doi:10.1016/j.jaci.2018.02.017.
- 13 Fecteau J-F, Kipps TJ. Structure and function of the hematopoietic cancer niche: focus on chronic lymphocytic leukemia. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; **4**: 61–73.
- 14 Criado I, Munoz-Criado S, Rodriguez-Caballero A, Nieto WG, Romero A, Fernandez-Navarro P *et al.* Host virus and pneumococcus-specific immune responses in high-count monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia: implications for disease progression. *Haematologica* 2017; **102**: 1238–1246.
- 15 Chudwin DS, Artrip SG, Schiffman G. Immunoglobulin G class and subclass antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; **44**: 114–121.

ARTÍCULO 3

“Respuesta inmune específica frente a virus recurrentes y S.pneumoniae en linfocitosis B monoclonal y leucemia linfática crónica: implicaciones en la progresión de la enfermedad”

Criado I,¹ Muñoz-Criado S,² Rodríguez-Caballero A,¹ Nieto WG,¹ Romero A,³ Fernández-Navarro P,⁴ Alcoceba M,⁵ Contreras T,⁶ González M,⁵ Orfao A,¹ Almeida J¹ y el Grupo de Atención Primaria de Salamanca para el estudio de la linfocitosis B monoclonal.

¹Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, USAL-CSIC), Departamento de Medicina y Servicio de Citometría (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, IBSAL y CIBERONC, Salamanca, España.

²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

³Centro de Atención Primaria de Salud Miguel Armijo, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, España.

⁴Centro de Atención Primaria de Salud de Ledesma, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, España.

⁵Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBMCC, IBSAL, CIBERONC y Departamento de Enfermería y Fisioterapia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁶Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

Haematologica, julio de 2017; 102(7):1238-1246

DOI: 10.3324/haematol.2016.159012

La información suplementaria correspondiente a este manuscrito está disponible en formato electrónico en la página web de la revista, así como en el Anexo I y el CD-ROM, disponibles al final de la presente memoria de tesis doctoral.

Introducción. A pesar de la gran heterogeneidad pronóstica de la leucemia linfática crónica (LLC), la mayoría de estos pacientes sufren procesos infecciosos, especialmente relacionados con las vías respiratorias. Recientemente se ha descrito que en fases previas de la enfermedad –i.e. en la linfocitosis B monoclonal de alto recuento (LBM^{hi})–, la frecuencia de infecciones que requieren ingreso hospitalario es también más elevada que en la población general (16% vs. 2,6%, respectivamente), siendo esta frecuencia similar a la observada en la LLC (18%). Las infecciones se deben a una profunda desregulación de la respuesta inmunológica, que se manifiesta frecuentemente en forma de hipogammaglobulinemia. Sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado el estado de la respuesta humoral en las fases iniciales de la enfermedad, especialmente en linfocitosis B monoclonal de bajo recuento (LBM^{lo}).

Objetivo. Evaluar el estado de la respuesta humoral en sujetos con LBM^{lo}, LBM^{hi} y LLC, tanto a nivel global, como específicamente frente a patógenos comunes presentes en nuestro medio, algunos de los cuales se han asociado con la ontogenia de la enfermedad.

Material y Métodos. Se analizaron un total de 249 individuos clasificados en cuatro grupos de estudio: donantes sanos (n=91), LBM^{lo} (n=71), LBM^{hi} (n=29) y LLC (n=58; Binet A, 32; Binet B/C, 26) en los que se determinaron los títulos globales de los principales isotipos de inmunoglobulina (i.e. IgM, IgG e IgA) en plasma mediante nefelometría convencional; asimismo, se realizó la determinación de los títulos de IgM e IgG específica frente a citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (VEB), virus de la gripe y *S.pneumoniae*, empleando técnicas inmunoenzimáticas (ELISA y quimioluminiscencia). Finalmente, se determinó la carga viral de CMV y VEB en plasma en 177 y 191 de los 249 individuos analizados, respectivamente.

Resultados. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles solubles de los principales isotipos de inmunoglobulinas entre donantes sanos y LBM^{lo}. Por el contrario, se observó una disminución progresiva de los niveles solubles de todos los isotipos de inmunoglobulina, desde la LBM^{hi} hasta las formas más avanzadas de LLC. Al calcular las ratios entre los títulos de IgM e IgG específicos de CMV, VEB y virus de la gripe, y los títulos de inmunoglobulina total del mismo isotipo (i.e. ratio Ig-específica/Ig-total), observamos de forma más evidente, la existencia de un aumento significativo de la proporción de anticuerpos IgM e IgG específicos de CMV en los pacientes con LLC respecto a los donantes sanos, siendo dicho aumento independiente del estadio clínico de la enfermedad. De manera similar, la proporción

de IgG específica del antígeno viral de la cápside (VCA) del VEB estaba significativamente más elevada, tanto en LBM^{hi} como en LLC, respecto a lo observado en donantes sanos, mientras que, a pesar de la existencia de una tendencia estadística ($P=0,056$), no existían diferencias en la proporción de IgM e IgG específicas del virus de la gripe, entre ninguno de los grupos de individuos estudiados. Por el contrario, se observó una reducción progresiva de los títulos (relativos) de IgG específica de *S.pneumoniae*, desde la LBM^{hi} hasta los estadios más avanzados de la LLC. Todas las muestras en las que se determinó la carga viral de CMV y VEB resultaron negativas, excepto en 3 casos (1 LBM^{hi} y 2 LLC en estadio A de Binet), en los que se detectó ADN de CMV y en 7 casos de LLC Binet A, en los que se detectó ADN de VEB.

Conclusiones. Los niveles relativos de inmunoglobulina específica frente a virus latentes (i.e. CMV y VEB) están más elevados en la LBM^{hi} y en la LLC (pero no en LBM^o), con respecto a donantes sanos; estos hallazgos podrían ser un reflejo de una respuesta inmune mantenida como consecuencia de la reactivación crónica (posiblemente asintomática) de infecciones latentes por estos patógenos, al aprovechar estos el estado de inmunodeficiencia característico de la enfermedad. Sin embargo, esta protección frente a virus latentes estaría acompañada de una desprotección frente a otros patógenos, como *S.pneumoniae*, lo que sugiere que los niveles totales de Ig en LBM y LLC no son un reflejo real de la posible protección existente frente a estos (y posiblemente otros) agentes infecciosos. En este contexto, la reactivación de una respuesta inmune (crónica) frente estos virus latentes como CMV y VEB podría ser a su vez, responsable también de la activación y expansión de las células B clonales, y por tanto, estar relacionada con la progresión de la enfermedad.



EUROPEAN
HEMATOLOGY
ASSOCIATION



Ferrata Storti
Foundation

Host virus and pneumococcus-specific immune responses in high-count monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia: implications for disease progression

Ignacio Criado,¹ Santiago Muñoz-Criado,² Arancha Rodríguez-Caballero,¹ Wendy G. Nieto,¹ Alfonso Romero,³ Paulino Fernández-Navarro,⁴ Miguel Alcoceba,⁵ Teresa Contreras,⁶ Marcos González,⁵ Alberto Orfao,¹ Julia Almeida¹ and The Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL

Haematologica 2017
Volume 102(7):1238-1246

¹Cancer Research Centre (IBMCC, USAL-CSIC), Department of Medicine and Cytometry Service (NUCLEUS), University of Salamanca and IBSAL, Salamanca; ²Microbiology Service, University Hospital of Salamanca; ³Gerencia de Atención Primaria de Salud, Centro de Atención Primaria de Salud Miguel Armijo, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL); ⁴Centro de Atención Primaria de Salud de Ledesma, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL); ⁵Hematology Service, University Hospital of Salamanca, IBMCC, IBSAL and Department of Medicine, University of Salamanca and ⁶Biochemistry Service, University Hospital of Salamanca, Spain.

*AO and JA contributed equally to this work and both should be considered as senior authors.

Correspondence:

orfao@usal.es

Received: October 26, 2016.

Accepted: April 5, 2017.

Pre-published: April 6, 2017.

doi:10.3324/haematol.2016.159012

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: www.haematologica.org/content/102/7/1238

©2017 Ferrata Storti Foundation

Material published in Haematologica is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>.

Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>, sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



ABSTRACT

Patients diagnosed with chronic lymphocytic leukemia (CLL) display a high incidence of infections due to an associated immunodeficiency that includes hypogammaglobulinemia. A higher risk of infections has also been recently reported for high-count monoclonal B-cell lymphocytosis, while no information is available in low-count monoclonal B-cell lymphocytosis. Here, we evaluated the status of the humoral immune system in patients with chronic lymphocytic leukemia (n=58), as well as in low- (n=71) and high- (n=29) count monoclonal B-cell lymphocytosis *versus* healthy donors (n=91). Total free plasma immunoglobulin titers and specific levels of antibodies against cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, influenza and *S.pneumoniae* were measured by nephelometry and ELISA-based techniques, respectively. Overall, our results show that both CLL and high-count monoclonal B-cell lymphocytosis patients, but not low-count monoclonal B-cell lymphocytosis subjects, present with relatively high levels of antibodies specific for the latent viruses investigated, associated with progressively lower levels of *S.pneumoniae*-specific immunoglobulins. These findings probably reflect asymptomatic chronic reactivation of humoral immune responses against host viruses associated with expanded virus-specific antibody levels and progressively decreased protection against other micro-organisms, denoting a severe humoral immunodeficiency state not reflected by the overall plasma immunoglobulin levels. Alternatively, these results could reflect a potential role of ubiquitous viruses in the pathogenesis of the disease. Further analyses are necessary to establish the relevance of such asymptomatic humoral immune responses against host viruses in the expansion of the tumor B-cell clone and progression from monoclonal B-cell lymphocytosis to CLL.

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in adults in Western countries. It is characterized by an expansion of $5 \times 10^9/L$ or more clonal B lymphocytes in peripheral blood (PB) that co-express CD5, CD19, CD23 and CD200, together with abnormally low levels of CD20, CD22, CD79b and surface immunoglobulins (sIg).¹⁻⁴ CLL typically occurs in elderly patients and has a highly variable clinical course.⁵ Despite the heterogeneous clinical outcome, the majority of CLL patients share a profound immune dysregulation which is already detected at the earliest stages of the disease, and that progressively becomes more severe during clinical observation, leading to patient death even in the absence of disease progression.⁶ The precise mechanisms underlying such immune dysregulation in CLL are not fully understood; however, hypogammaglobulinemia has been identified as one of the major factors involved,⁶⁻⁸ both in the immunodeficiency status and death of CLL patients.^{9,10} Thus, hypogammaglobulinemia is present in up to 85% of patients. During the course of disease, a direct association has been reported between the stage and duration of disease and the severity of hypogammaglobulinemia.^{11,12} As a result, infection is one of the most prevalent causes of morbidity and mortality in CLL.¹³ Approximately 80% of CLL patients have infections during the course of the disease; such infections particularly involve the respiratory tract, pneumonia accounting for approximately 75% of all pulmonary complications in CLL.¹⁴

Recent studies have reported that subjects at earlier stages of the disease [e.g. high-count monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL^{hi})] also have an increased risk of infections and a greater rate of infection-related deaths.¹⁵ Thus, hospitalization due to infection is significantly more common among MBL^{hi} cases than in the general population (16% vs. 2.6% after a median follow-up period of 10 years, respectively), the overall frequency of infection in MBL^{hi} individuals being similar to that of newly-diagnosed CLL patients (18%).¹⁵ Since vaccination represents an effective strategy to decrease the risk of infection in immunocompromised patients, the potential definition of optimal vaccination strategies in MBL^{hi} and CLL requires a more in depth and comprehensive understanding of the dysregulated immunological mechanisms in these patients.

In order to gain further insight into the nature, relevance and clinical significance of hypogammaglobulinemia in CLL and MBL patients, we evaluated the soluble levels of plasma antibodies specific for ubiquitous pulmonary infection-associated pathogens (i.e. influenza A and B viruses and *S.pneumoniae*) as well as other ubiquitous host pathogens, such as cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV), in newly-diagnosed untreated CLL patients at different stages of the disease (Binet A vs. Binet B/C), pre-leukemic MBL^{hi}, and low-count MBL (MBL^{lo}) subjects versus a large group of age- and sex-matched healthy individuals from the same geographical area.

Methods

Controls and patients

A total of 249 individuals were prospectively studied between November 2007 to November 2012. These subjects were classified

into four subgroups: healthy donors (controls; n=91), CLL-like MBL^{lo} (n=71), CLL-like MBL^{hi} (n=29), and newly-diagnosed previously untreated CLL patients (n=58). According to the World Health Organization (WHO) 2016 criteria,¹⁶ MBL was diagnosed whenever less than $5 \times 10^9/L$ clonal B cells with a CLL phenotype were present in PB, in the absence of other signs of disease; otherwise, diagnosis of CLL was established. Within CLL, 32 patients were classified as early stage CLL (Binet A), while the remaining 26 corresponded to advanced-stage CLL (Binet B/C).⁴ In turn, MBL^{lo} and MBL^{hi} cases were discriminated based on a cut-off value of less than $0.5 \times 10^9/L$ circulating clonal B cells with CLL-like phenotype, as described elsewhere.¹⁷ Additional information about the inclusion and exclusion criteria for selection of controls and patients, as well as procedures for sample collection and storage are detailed in the *Online Supplementary Methods*. The study was approved by the local Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca, and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Immunophenotypic studies

Immunophenotypic studies were performed on erythrocyte-lyzed PB samples, using a high-sensitive multicolor flow cytometry approach, previously described in detail.¹⁸ For this purpose, PB white blood cells (WBC) were systematically stained with the monoclonal antibody (MAb) combinations detailed in *Online Supplementary Table S1*. For flow cytometry data analysis, the INFINICYTTM software (Cytognos S.L., Salamanca, Spain) was used. All cases showed a clonal-imbalanced surface membrane (Sm) immunoglobulin (Ig)-kappa : SmIg-lambda ratio of >3:1 or <1:3¹⁹ and/or an aberrant CD5⁺ CLL(-like) B-cell population. The minimum number of clustered events required to define an abnormal B-cell population was 50 cells or more.

Measurement of soluble plasma levels of anti-viral and streptococcus pneumoniae (pneumococcus)-specific antibodies

Exposure to CMV, EBV, influenza A and B viruses, and pneumococcus were measured by immunoenzymatic-based approaches, including either enzyme-linked immunosorbent (ELISA) or chemiluminescent immune assays, using commercially available kits, as detailed in the *Online Supplementary Methods* and *Online Supplementary Table S2*. Of note, analysis of influenza A- and influenza B-specific IgM and IgG and *S.pneumoniae*-specific IgG plasma levels was restricted to those subjects who had not been vaccinated against influenza and *S.pneumoniae*, respectively, during the 9-year period prior to the study (*Online Supplementary Methods*). In each patient, total plasma levels of IgM, IgG and IgA were systematically measured in parallel by nephelometry.

Quantitation of CMV and EBV viral copy number in plasma

Detection and quantitation of CMV and EBV viral load in plasma was determined in a subset of 177 and 191 subjects, respectively, using commercially available kits: COBAS[®]AMPLiPrep/COBAS[®]TaqMan (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and EBV R-gene[®] (BioMerieux, Verniole, France), with strict adherence to the manufacturers' instructions.

Results

Clinical and laboratory features of MBL versus CLL patients

Overall, 249 individuals, including 119 males (48%) and 130 females (52%), with a mean age of 68 ± 11 years were

studied; there was a similar distribution according to age across the different patient groups and controls. Interestingly, while females predominated among MBL^{lo} cases (male/female ratio 1:2), MBL^{hi} and CLL showed a significantly ($P<0.01$) higher male/female ratio (5:1 and 1.2:1, respectively) (Table 1). As expected, abnormal blood cell counts were found only in MBL^{hi} and CLL patients (but not in MBL^{lo}), including lower platelet counts and hemoglobin levels among stage B/C CLL. Likewise, the absolute number of PB clonal B cells/ μ l progressively increased from MBL^{lo} subjects to advanced-stage CLL patients ($P<0.05$). CLL patients also showed a greater frequency of IGHV unmutated cases (from 20% in MBL^{lo} to 26% in MBL^{hi}, 41% in CLL stage A and 64% in CLL stage B/C; $P=0.04$), whereas MBL^{lo} cases showed a significantly lower frequency of cytogenetically altered CLL-like clones compared to both MBL^{hi} and CLL (30% vs. 68% and 70%, respectively; $P=0.002$) (Table 1). Of note, all subjects were from the same geographical area (Province of Salamanca, Northwest-Central Spain) and, therefore, shared a similar antigen environment.

Soluble Ig plasma levels in MBL and CLL versus healthy controls

Whereas total Ig plasma levels were within the normal range in MBL^{lo} cases, they were significantly decreased in MBL^{hi} and CLL patients versus both controls and MBL^{lo} cases (Figure 1A). Interestingly, progressively lower levels

of total plasma Igs were found from MBL^{hi} to stage A and stage B/C CLL cases, the latter two groups showing significantly lower amounts of plasma Igs versus MBL^{hi} cases ($P=0.04$ for stage A and $P=0.02$ for stage B/C) (Figure 1A). In more detail, none of the MBL^{lo} subjects presented with decreased total Ig plasma levels below the normal range, while the frequency of hypogammaglobulinemia increased from MBL^{hi} to early- and advanced-stage CLL patients: 7% versus 16% and 19%, respectively ($P<0.001$) (Figure 1A). Of note, progressively lower levels of plasma Igs were observed from MBL^{hi} to advanced stage CLL also for each Ig isotype (Figure 1B, C and D), particularly for IgM and IgA. Thus, all except one MBL^{lo} case showed normal amounts of IgM, IgG and IgA plasma levels; in contrast, 17% of MBL^{hi} subjects, 38% stage A CLL and 46% stage B/C CLL patients had decreased amounts of plasma IgM ($P<0.0001$). In addition, 10% of MBL^{hi} cases had decreased IgA plasma levels versus 16% of stage A CLL and 46% of stage B/C CLL patients ($P<0.0001$); in turn, IgG plasma levels were decreased in 14% of MBL^{hi} cases and 24% of CLL patients ($P>0.05$) versus none of the MBL^{lo} subjects.

CMV-, EBV- and influenza-specific IgM and IgG plasma levels in MBL and CLL patients versus healthy controls

As expected for a Mediterranean country, more than 90% of adults analyzed here had been exposed to both CMV and EBV before sample collection, regardless of the

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of controls versus monoclonal B-cell lymphocytosis subjects and chronic lymphocytic leukemia patients.

	Healthy donors (n=91)	MBL ^{lo} (n=79)	MBL ^{hi} (n=29)	CLL Stage A (n=32)	CLL Stage B/C (n=26)	CLL (n=58)	P
Age (years)	70 (43-87)	72 (43-95)	68 (52-85)	67 (45-85)	70 (41-85)	68 (41-85)	NS
Sex (M/F)	42% / 58%	35% / 65%	83% / 17%	56% / 44%	54% / 46%	55% / 45%	$P<0.01^b$
Hemoglobin (g/L)	147 (106-181)	144 (99-177)	144 (130-190)	145 (120-174)	118 (88-164)	136 (88-174)	$P<0.01^a$
N. of platelets $\times 10^9/L$	226 (90-388)	222 (119-262)	198 (85-386)	211 (112-408)	137 (67-271)	174 (67-408)	$P<0.01^a$
N. of leukocytes/ μ l	6,200 (3550-11,240)	6,090 (3650-9400)	11,550 (7154-15,660)	27,310 (13,520-393,530)	53,880 (16,630-289,420)	34,920 (13,520-393,530)	$P<0.01^{ab}$
N. of lymphocytes/ μ l	1678 (766-4124)	1774 (317-3749)	5250 (2291-9333)	18,591 (6469-381,409)	50,346 (12,779-282,098)	25,939 (6469-381,409)	$P<0.01^{ab}$
N. of B lymphocytes/ μ l	138 (31-776)	139 (31-478)	3,097 (978-4773)	17,727 (5134-369,288)	41,493 (8176-276,367)	21,352 (5134-369,288)	$P<0.01^{ab}$
N. of clonal B lymphocytes/ μ l	NA	0.731 (0024-82.24)	3.035 (921-4844)	17.686 (5065-369,288)	41.442 (8019-276,367)	21.130 (5065-369,288)	$P<0.01^{ab}$
Mutational status (Mut/UMut)	NA	*80%/20%	74%/26%	59%/41%	36%/64%	49%/51%	$P<0.05^c$
Cytogenetic alterations							
% cases altered	NA	*30%	68%	69%	71%	70%	$P<0.01^c$
% cases del13q14(D13S25)	NA	*30%	39%	50%	39%	45%	NS
% cases trisomy cr. 12	NA	*6%	25%	6%	33%	18%	NS
% cases del11q22(ATM)	NA	*0%	7%	13%	13%	13%	NS
% cases del17p13(TP53)	NA	*0%	0%	0%	0%	0%	NS

Results expressed either as median (range) or as percentage of cases for continuous and categorical variables, respectively. The CLL group includes both CLL Binet stage A and CLL Stage B/C cases. *CLL versus all other groups. ^aMBL^{hi} versus all other groups. ^bCLL versus healthy individuals. CLL: chronic lymphocytic leukemia; F: female; M: male; MBL^{hi}: high-count monoclonal B lymphocytosis; MBL^{lo}: low-count monoclonal B lymphocytosis; Mut: mutated; NA: not applicable; ND: not determined; NS: no statistically significant differences detected ($P>0.05$); Umut: unmutated. *Sample size restricted to 23 subjects in which molecular and cytogenetic determinations were performed.

diagnostic subgroup (*Online Supplementary Table S3*). In virtually every case the pattern of plasma antibodies specific for both viruses was consistent with past infection (i.e. CMV- or EBV-specific IgG-positive and IgM-negative plasma antibodies). In contrast, variable percentages of cases from the different study groups showed influenza virus-specific plasma Igs for the strains evaluated (*Online Supplementary Table S3*); in most of these cases, the pattern observed also corresponded to past exposure to the viruses. From the whole series of subjects who showed influenza virus-specific plasma Igs (n=127), 36 reported that they had been vaccinated against influenza virus before their recruitment; no statistically significant differences were observed in the distribution of these subjects in the distinct groups of individuals under study (*Online Supplementary Table S3*). Those patients found to have been previously exposed to any of the viruses investigated (i.e. those who showed increased plasma levels of at least one of the virus-specific Ig tested) were further evaluated for the corresponding pathogen-specific Ig plasma levels.

Overall, plasma levels of pathogen-specific IgM and IgG

antibodies did not follow the pattern observed for total IgM and IgG plasma levels in the different groups of subjects analyzed (Figure 1). Thus, there was no reduction of specific IgM and IgG against CMV, EBV viral capsid antigen (VCA) and influenza A and B in MBL^{hi} and even in CLL patients *versus* both controls and MBL^{lo} (*Online Supplementary Figure S1*). Regarding CMV-specific IgM and IgG titers and the amount of plasma IgM antibodies against VCA-EBV and the influenza virus, no significant differences were actually observed among individuals of the different groups studied (e.g. controls, MBL^{hi} and CLL) (*Online Supplementary Figure S1A, C and F*). In contrast, VCA-EBV-specific IgG plasma levels were higher ($P=0.01$) in CLL patients *versus* both controls and MBL^{lo} cases (*Online Supplementary Figure S1D*). However, clear differences emerged (or they increased) when the ratio between the plasma levels of each of these pathogen-specific IgG antibodies (CMV-, VCA-EBV- and influenza-specific IgG) plasma levels and the overall amount of plasma IgG per subject/patient was considered (Figure 2). Thereby, the CMV-specific IgM/total IgM and CMV-, VCA-EBV-specific-

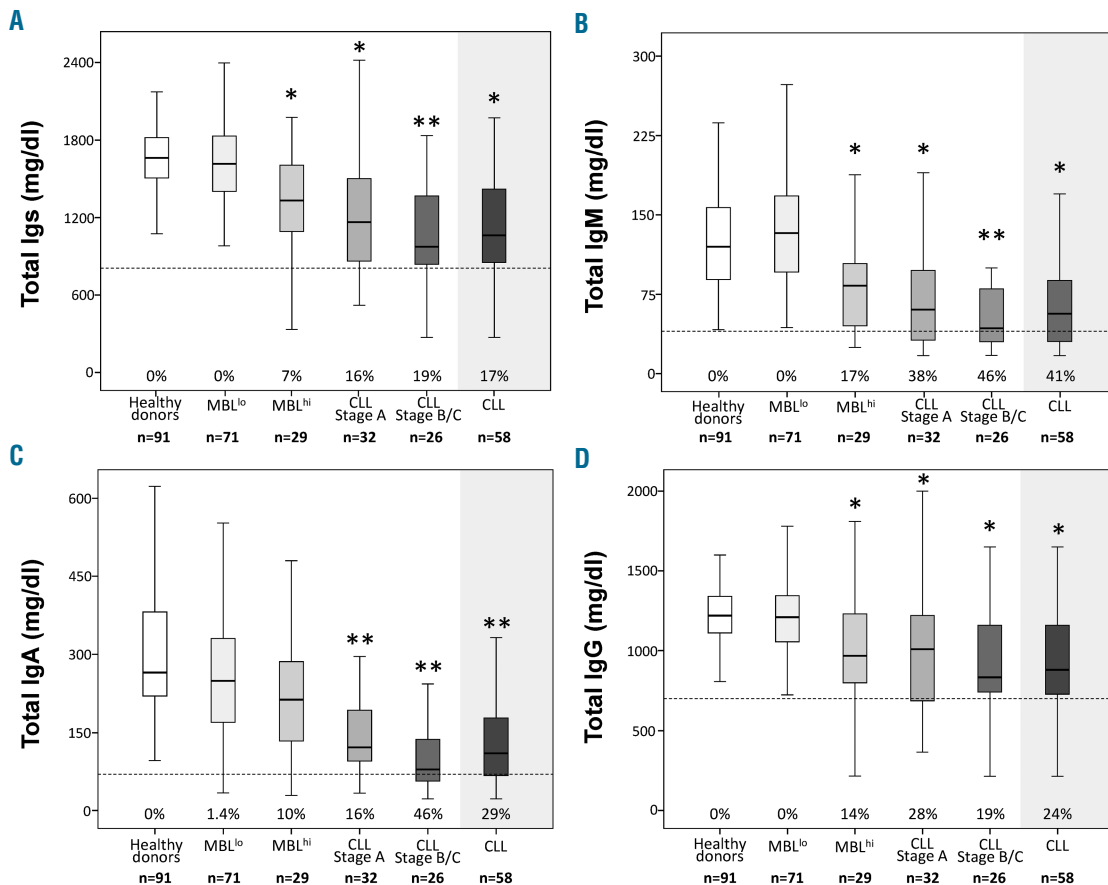


Figure 1. Soluble immunoglobulin (Ig) plasma levels in monoclonal B lymphocytosis (MBL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) versus healthy donors. (A) The overall amount of plasma immunoglobulins (mg/dl) determined by conventional nephelometry is shown for the different groups of individuals analyzed. (B-D) IgM, IgG and IgA plasma levels within the different groups of individuals studied, respectively. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the lines in the middle correspond to median values (50th percentile) and vertical lines represent the highest and lowest values that are neither outliers nor extreme values. Vertical dotted lines represent the inferior limit value of normality for each immunoglobulin. Dotted lines represent the lower limit of normality for each immunoglobulin (40 mg/dl; 700 mg/dl; and 70 mg/dl). Numbers under dotted lines represent the percentage of cases with plasma levels of the corresponding immunoglobulin found to be below normal values. * $P<0.05$ versus healthy donors and MBL^{lo}; ** $P<0.05$ versus healthy donors, MBL^{lo} and MBL^{hi}. MBL^{hi}: high-count monoclonal B lymphocytosis; MBL^{lo}: low-count monoclonal B lymphocytosis.

ic IgG/total IgG ratios were significantly higher in CLL ($P \leq 0.001$), particularly in stage B/C CLL cases ($P \leq 0.02$) versus healthy donors and MBL^{lo} subjects. Likewise, the influenza-specific IgG/total IgG ratio tended to be higher ($P = 0.056$) for CLL patients compared to healthy donors and MBL^{lo} cases (Figure 2). Of note, MBL^{hi} also showed significantly higher anti-VCA-EBV-specific IgG/total IgG plasma levels than controls and MBL^{lo} cases (Figure 2D). An exception to this general pattern was the EBNA-specific IgG plasma levels, which were found to be significantly reduced (vs. healthy donors) in both MBL^{hi} ($P = 0.01$) and CLL patients ($P = 0.002$), particularly in stage B/C CLL ($P = 0.002$) (Online Supplementary Figure S1E).

S. Pneumoniae-specific IgG plasma levels in MBL and CLL versus healthy controls

As mentioned above, *S. pneumoniae*-specific IgG plasma levels were quantified in those subjects who reported no previous administration of anti-PCP (*Pneumococcal Capsular Polysaccharide*) vaccination (Figure 3). Their amount, as well as the pathogen specific IgG/total IgG ratio were within the normal range in all MBL^{lo} subjects

and healthy controls analyzed (Figure 3A and 3). However, *S. pneumoniae*-specific IgG plasma levels were significantly reduced in MBL^{hi} and CLL patients versus both controls and MBL^{lo} (Figure 3A), in contrast to what was observed for virtually all viral pathogens described above, except the EBNA-specific IgG antibodies. Interestingly, no statistically significant differences were observed between MBL^{hi} and CLL as regards the overall amount of anti-*S. pneumoniae*-specific IgG plasma levels. Of note, the ratio between the anti-*S. pneumoniae*-specific IgG and total IgG plasma levels was similar among the distinct groups of subjects analyzed (Figure 3B), as both the *S. pneumoniae*-specific IgG and the overall IgG plasma levels directly correlated within each group of subjects analyzed.

CMV and EBV viral load and virus-specific Ig titers

Overall, viral load for CMV was studied in plasma from 177 subjects (53 controls, 56 MBL^{lo}, 22 MBL^{hi} and 46 CLL patients). No viral DNA was detected in any sample except 3 cases (1 MBL^{hi} and 2 CLL Binet A subjects), in which the viral load could not be precisely quantified, as

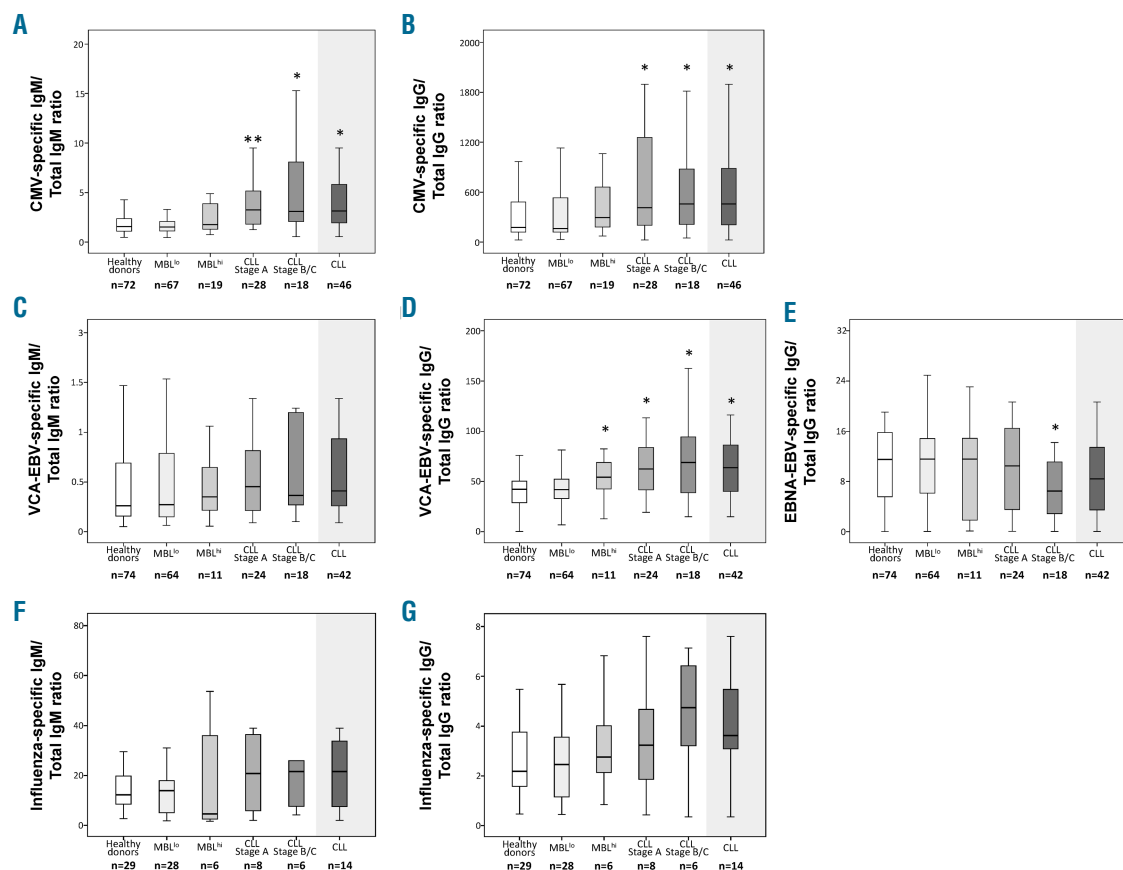


Figure 2. Ratio between pathogen-specific immunoglobulin (Ig) plasma levels and total immunoglobulin plasma levels per Ig isotype in monoclonal B lymphocytosis (MBL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients versus healthy subjects. (A and B) Ratio between cytomegalovirus (CMV)-specific IgM and IgG plasma titers and the overall plasma IgM and IgG levels, respectively. (C and D) Ratio between viral capsid antigen (VCA)-Epstein-Barr virus (EBV)-specific IgM and IgG titers in plasma and the overall amount of IgM and IgG in plasma, respectively. (E) Anti Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA)-EBV-specific IgG/total IgG plasma level ratio. (F and G) Influenza (strains A + B)-specific/total IgM and IgG ratios, respectively. Only data on seropositive subjects for each pathogen are included in this figure. (F and G) Data presented correspond only to subjects who referred no previous vaccination against influenza. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the lines in the middle correspond to median values (50th percentile), whereas vertical lines represent the highest and lowest values that are neither outliers nor extreme values. * $P < 0.05$ versus healthy donors and MBL^{lo}; ** $P < 0.05$ versus healthy donors, MBL^{lo} and MBL^{hi}.

it was below the limit of quantification of the method (<137 IU/ml). In turn, EBV DNA load (measured in 191 samples: 57 controls, 59 MBL^{lo}, 23 MBL^{hi}, 53 CLL patients) was detected in plasma from 7 of 53 Binet A CLL patients (13%), while systematically undetectable in the other three groups ($P < 0.0001$). No statistically significant differences in gender distribution, age, number of clonal B cells and EBV (VCA)-specific IgM and IgG titers were found between CLL cases with quantifiable EBV DNA in plasma versus negative CLL cases. Also, no statistical correlation was found between the number of EBV DNA copies (median of 3.6 DNA copies/ μ l; range 1.4-22.8 DNA copies/ μ l) and EBV-specific immunoglobulin titers in plasma for those 7 EBV-viral load-positive CLL cases.

Discussion

Infection is one of the most frequent causes of death in CLL (approx. 30-50% of CLL patients).⁸ Although the specific mechanisms underlying immune dysregulation in CLL are not fully understood⁸, hypogammaglobulinemia, together with T-cell abnormalities, are common features of the CLL-associated immunodeficiency status, the former affecting up to 85% of the patients already at diagnosis or during the course of their disease.^{9,10} The frequency and severity of hypogammaglobulinemia (at the expense of all major Ig isotypes) increase from MBL subjects to early and advanced stage CLL patients. Here, we confirm and extend on these observations. Thus, we show for the first time that total soluble Ig plasma levels are within normal values in MBL^{lo} subjects, regardless of the Ig isotype evaluated; in contrast, hypogammaglobulinemia was a relatively frequent feature of MBL^{hi} cases. Of note, the degree of decreased IgM and IgG plasma levels in MBL^{hi} was similar to that observed in stage A CLL. In a recent study, Glancy *et al.* have even reported a higher frequency of decreased IgG levels in MBL^{hi} (i.e. 7 of 24 MBL^{hi} cases, which represents a frequency of IgG hypogammaglobu-

linemia of 29%²⁰ vs. 14% in our series). This apparent discrepancy might be due to the fact that our series mostly comprised MBL^{hi} cases with lower numbers of clonal B cells studied at diagnosis, while 4 of 7 MBL^{hi} cases reported by Glancy *et al.* to have low IgG titers, had absolute lymphocyte counts more than $4 \times 10^9/L$. Nevertheless, it should be noted that we did not find any correlation between soluble Ig plasma levels and the number of clonal B cells in PB, within each group of subjects analyzed (*data not shown*). In contrast, a statistically significant direct correlation was found between total Ig plasma levels and the number of normal residual B cells among CLL patients ($r=0.29$, $P=0.04$). Therefore, presence of hypogammaglobulinemia in MBL^{hi} cases could also reflect a defective normal residual B-cell function and it might contribute to explain the near 3-fold increased frequency of infection observed among these subjects versus the general population of the same age and having the same comorbidities, to that of newly-diagnosed CLL.¹⁵ Altogether, these findings suggest that antibody-related immunodeficiency might emerge before the onset of CLL, already at an MBL^{hi} state, preceding (or potentially favoring) malignant transformation and progression of the disease.

Despite a progressive reduction of (total) soluble Ig plasma levels from MBL to advanced CLL, similar levels of CMV-specific IgM and IgG, VCA-EBV-specific IgM and influenza-specific IgM and IgG were found among the five groups analyzed (i.e. healthy donors, MBL^{lo}, MBL^{hi}, early CLL and advanced stage CLL). Indeed, VCA-EBV-specific IgG levels were even increased in CLL patients versus healthy subjects. Furthermore, when the ratio between each of these Ab levels and the total plasma levels of the corresponding Ig isotype (IgM or IgG) were considered, progressively greater fractions of the above referred antigen-specific antibodies per-isotype were found from MBL^{hi} to stage A and stage B/C CLL patients, respectively. Our findings on the antibody levels against CMV confirm previous results on CLL reported by Vanura *et al.* who also showed that, despite progressive decay of total IgM and

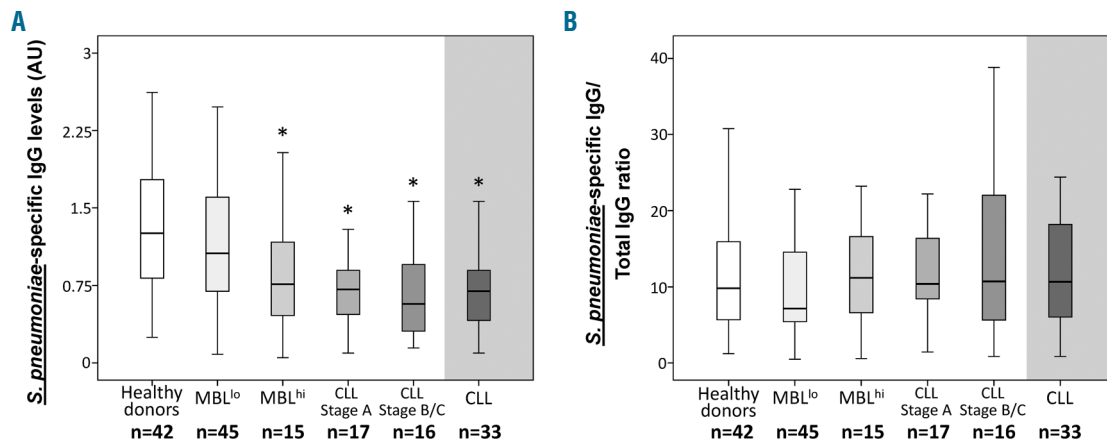


Figure 3. *Streptococcus pneumoniae*-specific IgG plasma levels in monoclonal B lymphocytosis (MBL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients versus healthy controls. (A) Titers of antibody-specific plasma levels against the pneumococcal polysaccharide antigen for each group of individuals analyzed. (B) Ratio between anti-pneumococcus-specific IgG and total IgG plasma levels for each group of subjects investigated. Only data from those subjects that did not receive vaccination against *S. pneumoniae* are displayed. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the lines in the middle correspond to median values (50th percentile), while vertical lines represent the highest and lowest values that are neither outliers nor extreme values. * $P < 0.05$ versus healthy donors and MBL^{lo}. MBL^{hi}: high-count monoclonal B lymphocytosis; MBL^{lo}: low-count monoclonal B lymphocytosis.

IgG subclasses, the CMV-specific immune response may be preserved even in CLL cases with advanced disease.²¹ Here, we confirm and extend on these findings by showing for the first time that: i) this behavior is already detectable at the MBL^{hi} stage; and ii) it is also common to other antibody responses against EBV and the influenza virus in non-vaccinated individuals, despite the mechanisms by which influenza infects cells are completely different from those of CMV and EBV.²²⁻²⁴ As mentioned above, we did observe decreased titers of EBV-specific IgG levels in both MBL^{hi} and CLL; interestingly, this was restricted to the antibody response against the EBNA-EBV antigen, but not the VCA-EBV antigen. The EBNA-EBV protein is located in the nucleus of infected host cells and it acts as a transcription factor for the virus, allowing for its replication inside the cell;²³ in contrast, the VCA-EBV protein is a structural component of the capsid of the virus.²⁵ Therefore, the (humoral) immune response against the VCA-antigen might only occur if infected cells are lysed and active viral replications occurs. Therefore, our results suggest that like CMV, EBV probably undergoes a mild (undetectable) reactivation, whenever an immunodeficiency state has been acquired, but fully bloomed EBV and CMV infections can still be controlled, as reflected by the preserved production of specific antibodies against both viruses in MBL^{hi} and CLL patients²¹ and the detection of quantifiable EBV DNA in plasma of CLL cases but not MBL. Long-term monitoring of virus-specific Ig plasma levels in CLL *versus* MBL *versus* healthy donors is required to validate this hypothesis.

In contrast to the general pattern found for the plasma levels of antibodies against the ubiquitous viruses here investigated, a significant reduction was observed in the plasma levels of pneumococcus-specific IgG from MBL^{hi} to stage B/C CLL, in parallel to the overall decrease in total IgG plasma levels. These findings further suggest that, while the antibody-mediated immune response against ubiquitous pathogens (e.g. human herpesviruses and influenza virus) is still preserved and the virus is actively controlled in immunocompromised MBL^{hi} and CLL patients, protection against other pathogens (i.e. pneumococcus) is progressively lost, placing these patients at risk of severe infection and death. In line with this hypothesis, CMV disease is infrequent among untreated CLL patients compared to other immunocompromised patients.^{13,26} In contrast, CLL patients frequently present respiratory tract infections caused by encapsulated bacteria, particularly *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*,²⁷ further supporting a unique dysregulation of immunosurveillance against infectious agents in MBL^{hi} and CLL.

To the best of our knowledge, no studies have been reported so far about the immune response profile against different pathogens in MBL^{lo} subjects. As no differences were detected in both total and pathogen specific Ig plasma titers in MBL^{lo} *versus* age-matched healthy subjects of the same geographical area, it might be expected that the antibody response of these subjects remains normal or at most little altered. Altogether, these findings suggest that the onset of dysregulated antibody-based immune responses might occur in the transition from MBL^{lo} to MBL^{hi} and CLL, being associated with a clinically silent reactivation of preserved T-cell dependent antibody responses against host viruses. If this holds true, and chronic baseline activation of antibody responses against host viruses occurs in MBL^{hi} and CLL patients, such a

response could also potentially affect the tumor clone and contribute to its expansion and progression of the disease. In line with this hypothesis, it has been shown that most MBL^{lo} subjects show (oligoclonal) expansions of CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells²⁸ which have a limited TCRv β repertoire and participate in immune responses against chronic viral infections, particularly against CMV.²⁹ There is even stronger evidence to suggest that CLL evolves from repetitive activation of particular B-cell clones through B-cell receptor (BCR) triggering by conventional antigens,³⁰ which, in the light of the results reported here, increase in the CMV- and EBV-specific IgG/total Ig ratio in both MBL^{hi} and CLL patients. This might further suggest a potential role for ubiquitous viruses in the pathogenesis of the disease. Previous findings showing an association between the presence of CMV- and EBV-DNA in blood of CLL patients who express stereotyped IGHV4-34 BCRs³¹ would further support this hypothesis. However, here we only analyzed a relatively limited number of cases within each study group, particularly within the MBL^{hi} group, and, therefore, further long-term longitudinal studies in MBL and CLL in larger series of subjects are necessary in order to elucidate the value of (total and pathogen-specific) Ig plasma levels, as a surrogate marker for a normal *versus* abnormal B-cell function, and to determine both the risk of progression from MBL to CLL and the potential need for adoption of specific active immunotherapy measures for patients at risk of life-threatening infections. In this regard, extensive research on the effectiveness of vaccines, particularly against influenza and *S.pneumoniae*, has been carried out in CLL, while there is limited information on MBL^{hi}.¹⁵ Thus, response to vaccination against both polysaccharide (e.g. classical multivalent pneumococcal vaccines^{32,33}) and protein antigens (e.g. tetanus toxoid and influenza virus^{34,35}) has been shown to be associated with poor seroprotective responses in CLL, even after various doses. Such defective antibody responses have been related to a broad variety of immune defects including complement dysregulation, T-cell impaired function and altered antigen presentation, in addition to B-cell deficiency.^{8,9,27,36,37} Because of this, vaccination of CLL patients early after diagnosis, and particularly even at the MBL stage when better responses might be expected,^{8,33} has been proposed as a potentially effective strategy to improve serological immune protection of CLL patients against the most common pathogens. Parallel analyses focused on the humoral immunity and immune responses other than just the evaluation of plasma antibody levels are required to fully understand the uniqueness of the immunodeficiency status of MBL^{hi} and CLL patients.

In summary, we report on the existence of a significant and selective, defective antibody protection against *S.pneumoniae* in CLL which emerges already among MBL^{hi} to early stage CLL and worsens through progression of the disease. Such an immune defect might be associated with an active, but silent, response against host viruses such as CMV, EBV and influenza, for which preserved antibody serum levels are detected, even in advanced CLL. These results suggest that chronic viral re-activation might contribute to the preserved host virus-specific antibody titers through sustained immune responses, which might also favor parallel expansion of the tumor B-cell clone and progression from MBL^{hi} to CLL. Further studies in larger MBL and CLL patient cohorts with long-term follow up and

sequential serological analyses are necessary to confirm this hypothesis.

Primary Health Care Group of Salamanca for the study of MBL: list of members (alphabetical order): Alonso Martín, María Monserrat (C.S. Fuentes de Oñoro); Asensio Oliva, María Carmen (C.S. Santa Marta de Tormes), Báez Hernández, Pilar (C.S. Garrido Sur); Cabo Sastre, Luis (C.S. Ledesma); Carreño Luengo, María Teresa (C.S. Ledesma); Casado Romo, José María (C.S. Alba de Tormes); Cubino Luis, Rocio (C.S. Sancti Spiritus); De Vega Parra, José (C.S. Peñaranda); Franco Esteban, Eloy (C.S. Pizarrales-Vidal); García García, María Concepción (C.S. Guijuelo); García Rodríguez, Bernardo Lucio (C.S. La Alberca); Garzón Martín, Agustín (C.S. Peñaranda); Goenaga Andrés, Rosario (C.S. Ledesma); Gómez Cabrera, Rosalía (C.S. Garrido Sur); Gómez Sánchez, Francisco (C.S. Periurbana Norte); González Moreno, Josefa (C.S. Guijuelo); González Vicente, Ángel Carlos (C.S. Aldeadávila de la Ribera); Guarido Mateos, José Manuel (C.S. Vitigudino); Hernández Sánchez, María Jesús (C.S. Vitigudino); Herraes Martín, Ricardo (C.S. La Alberca); Herrero Sánchez, Amparo (C.S. Fuentes de Oñoro); Jiménez Ruano, María Josefa (C.S. Garrido Norte); Jimeno Cascón, Teresa Basa (C.S. Elena Ginel Díez); Macías Kuhn, Francisco (C.S. Ledesma); Mateos Rubio, Pablo (C.S. Ledesma); Márquez Velasco, María Salud (C.S. Sancti Spiritus); Merino Palazuelo, Miguel (C.S. Fuentes de Oñoro); Miguel Lozano, Rubén (C.S. Garrido Norte); Montero Luengo, Juan (C.S. San Juan); Muriel Díaz, María Paz (C.S. Miguel Armijo); Pablos Regueiro, Araceli (C.S. Vitigudino); Pascual Martín, J. Antonio (C.S. Fuentes de Oñoro); Pastor Alcalá, Luis (C.S. Vitigudino); Pedraza García, Jesús (C.S. Vitigudino); Pérez Díaz, Manuel (C.S. Pizarrales-Vidal); Pérez García, Manuel (C.S. Alba de Tormes); Prieto Gutiérrez, María Teresa (C.S. Peñaranda); Ramos Arranz, Manuel (C.S. Ledesma); Ramos Mongue, Aurora Esther (C.S. Ledesma);

Rodríguez Medina, Ana María (C.S. Alba de Tormes); Rodríguez Vegas, Margarita (C.S. Ledesma); Romo Cortina, Javier (C.S. Elena Ginel Díez); Roselló Carmen, Elena (C.S. Vitigudino); Sánchez Alonso, Begoña (C.S. Aldeadávila de la Ribera); Sánchez Bazo, Begoña (C.S. Aldeadávila de la Ribera); Sánchez White, Nicolás (C.S. Sancti Spiritus); Sandín Pérez, Rafael (C.S. San José); Sanz Santa-Cruz; Fernando (C.S. Capuchinos); Soto Jiménez, Francisco (C.S. Santa Marta de Tormes); Velasco Marcos, María Auxiliadora (C.S. Elena Ginel Díez); Vicente López, Horacio Marcos (C.S. Aldeadávila de la Ribera); Vicente Santos, M. Sebastián (C.S. Aldeadávila de la Ribera).

Acknowledgments

The authors thank María Teresa Blázquez Martín and María del Mar Clemente Aguilar for their technical support in both serological assays and quantitation of viral load in plasma.

Funding

This work was supported by the: RD06/0020/0035 and RD12/0036/0048 grants from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, (Madrid, Spain and FONDOS FEDER); CB16/12/00400 grant (CIBER-ONC, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain and FONDOS FEDER); the FIS PI06/0824-FEDER, PS09/02430-FEDER, PI12/00905-FEDER and DTS15/00119-FEDER grants, from the Fondo de Investigación Sanitaria of Instituto de Salud Carlos III; the GRS206/A/08 grant, (Ayuda al Grupo GR37 de Excelencia, SAN/1778/2009) from the Gerencia Regional de Salud, (Consejería de Educación and Consejería de Sanidad of Castilla y León, Valladolid, Spain); FS/1-2010 and FS/19-2013 grants, from the Fundación Memoria D. Samuel Solórzano, (University of Salamanca, Salamanca, Spain).

References

- Strati F, Shanafelt TD. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood*. 2015; 126(4):454-462.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-cappio F, Dighiero G, Do H. 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.
- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352(8):804-815.
- Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2015; 90(5):446-460.
- Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*. 2005; 90(3):391-399.
- Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood*. 2015;126(5):573-581.
- Lanasa MC, Weinberg JB. Immunologic aspects of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Immunol Res*. 2011;49(1-3):269-280.
- Whitaker JA, Shanafelt TD, Poland GA, Kay NE. Room for improvement: Immunizations for patients with monoclonal B-cell lymphocytosis or chronic lymphocytic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2014;12(7):440-450.
- Hamblin AD, Hamblin TJ. The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *Br Med Bull*. 2008;87(1):49-62.
- Freeman JA, Crassini KR, Best OG, et al. Immunoglobulin G subclass deficiency and infection risk in 150 patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(1):99-104.
- Orfao A, Gonzalez M, San Miguel JF, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia: prognostic value of the immunophenotype and the clinico-haematological features. *Am J Hematol*. 1989;31(1):26-31.
- Parikh SA, Leis JF, Chaffee KG, et al. Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia: Natural history, clinical correlates, and outcomes. *Cancer*. 2015;121(17):2883-2891.
- Morrison VA. Infectious complications in patients with chronic lymphocytic leukemia: pathogenesis, spectrum of infection, and approaches to prophylaxis. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009;9(5):365-370.
- Ahmed S, Siddiqui AK, Rossoff L, Sison CP, Rai KR. Pulmonary Complications in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer*. 2003;98(9):1912-1917.
- Moreira J, Rabe KG, Cerhan JR, et al. Infectious complications among individuals with clinical monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): a cohort study of newly diagnosed cases compared to controls. *Leukemia*. 2013;27(1):136-141.
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390.
- Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia*. 2010;24(3):512-520.
- Nieto WG, Almeida J, Romero 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.
19. Nieto WG, Almeida J, Teodosio C, et al. Commentary: Comparison of current flow cytometry methods for monoclonal B cell lymphocytosis detection. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78 Suppl 1:54-9.
 20. Glancy E, Siles R. Monoclonal B-cell lymphocytosis and hypogammaglobulinaemia. *Br J Haematol*. 2016;173(2):316-317.
 21. Vanura K, Rieder F, Kastner M-T, et al. Chronic lymphocytic leukemia patients have a preserved cytomegalovirus-specific antibody response despite progressive hypogammaglobulinemia. *PLoS One*. 2013;8(10):e78925.
 22. Sun X, Whittaker GR. Entry of influenza virus. *Adv Exp Med Biol*. 2013;790:72-82.
 23. Cohen JL. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000;343(7):481-492.
 24. Spector DH. Human cytomegalovirus riding the cell cycle. *Med Microbiol Immunol*. 2015;204(3):409-419.
 25. Moss DJ, Burrows SR, Khanna R. EBV: immunobiology and host response. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press; 2007;Chapter 51.
 26. Laurenti L, Piccioni P, Cattani P, et al. Cytomegalovirus reactivation during alemtuzumab therapy for chronic lymphocytic leukemia: incidence and treatment with oral ganciclovir. *Haematologica*. 2004;89(10):1248-1252.
 27. Pasiarski M, Rolinski J, Grywalska E, et al. Antibody and plasmablast response to 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in chronic lymphocytic leukemia patients - Preliminary report. *PLoS One*. 2014;9(12):1-14.
 28. Fazi C, Scarfó L, Pecciarini L, et al. General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood*. 2011;118(25):6618-6625.
 29. Suni MA, Ghanekar SA, Houck DW, et al. CD4+CD8dim T lymphocytes exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in response to HCMV and HIV-1 antigens. *Eur J Immunol*. 2001;31(8):2512-2520.
 30. Widhopf GF 2nd, Goldberg CJ, Toy TL, et al. 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(6):3137-3144.
 31. Kostareli E, Hadzidimitriou A, Stavroyianni N, et al. Molecular evidence for EBV and CMV persistence in a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Leukemia*. 2009;23(5):919-924.
 32. Sinisalo M, Aittoniemi J, Oivanen P, Käyhty H, Olander RM, Vilpo J. Response to vaccination against different types of antigens in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;114(1):107-110.
 33. Sánchez-Ramón S, Dhalla F, Chapel H. Challenges in the Role of Gammaglobulin Replacement Therapy and Vaccination Strategies for Hematological Malignancy. *Front Immunol*. 2016;7:317.
 34. Sinisalo M, Aittoniemi J, Käyhty H, Vilpo J. Vaccination against infections in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(4):649-652.
 35. Pollyea DA, Brown JMY, Horning SJ. Utility of influenza vaccination for oncology patients. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2481-2490.
 36. Sinisalo M, Vilpo J, Itälä M, Väkeväinen M, Taurio J, Aittoniemi J. Antibody response to 7-valent conjugated pneumococcal vaccine in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Vaccine*. 2007;26(1):82-87.
 37. Van Der Velden AMT, Van Velzen-Blad H, Claessen AME, et al. The effect of ranitidine on antibody responses to polysaccharide vaccines in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol*. 2007;79(1):47-52.

Discusión

Hoy día, se considera que está bien establecida la naturaleza pre-leucémica de la LBM^{hi}, dado que prácticamente todos los casos de LLC están precedidos por LBM^{hi}, y que esta última presenta una tasa de progresión anual a LLC con necesidad de tratamiento del 1-2%.^{214,497} Por el contrario, en el momento de iniciar este trabajo no se había podido demostrar aún una relación directa entre la LBM^{lo} y la LLC, a pesar de la elevada prevalencia de la primera en la población general y la similitud de sus características fenotípicas y genéticas con las de las células tumorales de la LLC.^{172,192}

En parte, esto es debido a que no existían estudios de seguimiento a medio-largo plazo (5-10 años) de series amplias de sujetos con LBM^{lo}, que pudieran contribuir a entender si verdaderamente la LBM^{lo} constituye o no una condición pre-leucémica, y qué factores podrían estar asociados a un mayor riesgo de transformación a LLC.^{189,524,550} Por este motivo, el primer objetivo del trabajo realizado en la presente tesis doctoral se centró en determinar la evolución (a medio plazo) de una amplia cohorte de sujetos con LBM^{lo}, a formas más avanzadas de la enfermedad (LBM^{hi} y LLC), analizando para ello, las características clínicas de los sujetos con LBM^{lo} y las propiedades biológicas de sus células B clonales, tras un tiempo de seguimiento de unos 7 años desde el diagnóstico.

Por otro lado, está bien establecida la existencia de un estado de inmunodeficiencia manifiesta en la LLC; aunque los mecanismos concretos implicados en su génesis son poco conocidos, este estado de inmunodeficiencia está presente ya en sujetos con LBM^{hi}, asociado a una tasa de morbilidad y mortalidad por infecciones incrementadas en pacientes de LLC.^{273,274,276} En conjunto, estos hallazgos sugieren que dicha inmunodeficiencia podría instaurarse ya desde etapas relativamente tempranas de la enfermedad, a nivel de LBM. El segundo objetivo de este trabajo, se centró en evaluar el estado del sistema inmune, y en especial del compartimiento de células B de SP responsables de la inmunidad humoral, en LBM y LLC. Con ello pretendíamos comprender mejor los mecanismos y componentes celulares, potencialmente implicados en dicho estado de inmunodeficiencia característico de ambas entidades, pudiendo incluso llegar a establecer, en caso de que fuera posible, el momento exacto o fase de la enfermedad en la que se instauraría dicho estado de inmunodeficiencia.

Pese al referido estado de inmunodeficiencia global, en la LLC existe un incremento global de linfocitos T circulantes, asociado a expansiones oligoclonales de células T, específicas

de virus como CMV y VEB, de significado desconocido. Nuestro tercer objetivo tenía como finalidad determinar el estado de la respuesta humoral frente a ambos virus, en sujetos con LBM y pacientes con LLC, con el fin de entender mejor su posible implicación en la patogénesis de la enfermedad.

En este apartado de la memoria del trabajo doctoral, abordaremos de forma secuencial la discusión de los resultados obtenidos en relación con cada uno de estos tres objetivos y su impacto en el avance del conocimiento que tenemos ahora acerca de la ontogenia de la LLC.

1.- Evolución a medio plazo de la linfocitosis B monoclonal de bajo recuento

En el momento de iniciar este trabajo, solo se habían publicado dos estudios de seguimiento de individuos con LBM^o. Ambos, tenían como objetivo evaluar si los clones linfoides B persistían en el tiempo, y determinar la tasa de progresión a formas más avanzadas de la enfermedad.^{189,524,550} En el estudio del grupo italiano de Fazi et al., los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que, tras 3 años de seguimiento, 90% de los clones de tipo LLC y 67% de los clones con fenotipo de tipo no-LLC persistían.¹⁸⁹ A su vez, el grupo brasileño de Matos et al. confirmó la persistencia de las poblaciones B clonales en la SP del 100% de sus casos de LBM^o identificadas, tras un seguimiento de aproximadamente 7 años y medio;^{524,550} el tamaño de esta última serie fue muy inferior a la del grupo italiano (5 individuos en el estudio brasileño, frente a 75 individuos analizados por el grupo italiano).^{524,551}

En nuestra serie, reevaluamos un total de 65 casos de LBM^o de la cohorte original de 91 individuos de la población general de Salamanca, que habían mostrado la presencia de clones B de tipo LBM^o. El tiempo de seguimiento en nuestro estudio fue como mínimo de 5 años desde el estudio basal (mediana de 7 años), por lo que este constituye el estudio de seguimiento de MBL^o más prolongado en el que se incluye un número relativamente elevado de casos. En términos generales, en todos los casos reevaluados a los 7 años de nuestra cohorte, pudimos confirmar la presencia en SP de al menos una población de linfocitos B clonales, con las mismas características inmunofenotípicas que las observadas en el análisis inicial. La aparente contradicción entre nuestros resultados (y los del grupo brasileño, aún con un número de casos muy inferior al nuestro) y los del estudio italiano –en el que no se detectan poblaciones B clonales en SP en todos los casos reevaluados–, podría ser debida a que la sensibilidad de la técnica de

citometría aplicada ha sido diferente: en nuestro estudio fue ≈ 10 veces más sensible, al haberse analizado más de 5 millones de leucocitos por caso vs. 500.000 células en el estudio italiano. A la vista de estos resultados, podemos concluir que la LBM^{lo} (tanto de tipo LLC como no-LLC) no es una entidad transitoria que se genere como consecuencia de una respuesta puntual frente a un estímulo, sino que persiste durante largos periodos de tiempo, de al menos 7 años. No obstante, la persistencia en el tiempo de estas pequeñas poblaciones de linfocitos B clonales en SP, no descarta que puedan existir estímulos externos a la célula B mantenidos en el tiempo (por ejemplo, estimulación crónica mediada por autoantígenos o xenoantígenos), que induzcan y/o favorezcan la aparición y/o mantenimiento de dichas poblaciones clonales de células B tipo LBM^{lo}.

Al comparar el tamaño de las poblaciones B clonales (en número de células/ μ L de SP) entre los dos momentos del estudio, observamos además que alrededor de dos tercios de los clones B analizados, tanto de tipo LLC como no-LLC, aumentaban significativamente su tamaño a los 7 años de seguimiento; en concreto, el incremento medio del tamaño de los clones B era del doble de células, con respecto al momento basal. En el tercio restante de casos, el tamaño de los clones B se mantuvo estable o incluso disminuyó, sin llegar a hacerse indetectables en ninguna de las LBM^{lo} estudiadas.

Independientemente del cambio en el tamaño de los clones B, también observamos en el momento de la reevaluación, que los clones de fenotipo de tipo LLC mostraban un aumento significativo (más del doble a los 7 años vs. el momento basal) en la frecuencia de alteraciones citogenéticas asociadas a LLC. La del(13q14)(D13S25) asociada a buen pronóstico en la LLC, fue la alteración más frecuentemente encontrada en ambos momentos del estudio, y la que más aumentó su porcentaje a lo largo del periodo de seguimiento. En su conjunto, estos hallazgos sugieren que los clones LBM^{lo} no solo persisten en el tiempo, sino que además son muy dinámicos, ya que en la mayoría de los casos aumentan de tamaño y adquieren nuevas alteraciones citogenéticas a lo largo del tiempo, que llegan a afectar a un porcentaje de casos ($\approx 60\%$) que se acerca al observado en la LBM^{hi} y la LLC (75-85%). Asimismo, estos hallazgos sugieren que la adquisición de alteraciones citogenéticas ocurriría en fases muy tempranas de la enfermedad (incluso antes de que ocurra un crecimiento clínicamente significativo del tamaño del clon) y que su frecuencia se iría incrementando de forma significativa desde la MBL^{lo} (30-

60% de los casos según el tiempo de evolución) a la LBM^{hi} y la LLC (75-80%).^{361-365,367,454} Si tenemos en cuenta que i) no existe una asociación clara entre la presencia de alteraciones citogenéticas y los cambios en el tamaño de los clones en la LBM^{lo}, y que ii) aunque las alteraciones citogenéticas aparezcan en fases tempranas de la enfermedad, lo hacen sobre clones ya establecidos, nuestros resultados indican también que dichas alteraciones probablemente no constituyen eventos genéticos primarios. En tal caso, podrían desempeñar un papel secundario, bien condicionando una mayor inestabilidad genética (que pudiera favorecer la acumulación de nuevas mutaciones/alteraciones), bien confiriendo una supervivencia celular más prolongada, que a su vez favorecería aún más la persistencia y acumulación de estas poblaciones clonales con el tiempo. Otro hallazgo de nuestro estudio, que apoyaría también dicho papel secundario de las alteraciones genéticas típicas de la LLC, adquiridas en estas fases iniciales de la enfermedad por parte de los clones LBM^{lo}, es la baja frecuencia de transformación/progresión a LBM^{hi}/LLC. Así, la tasa de progresión anual de LBM^{lo} a LBM^{hi} observada fue de alrededor de 0,2% y, según la cinética de crecimiento constatada a lo largo de los 7 años de seguimiento, el tiempo medio que se necesitaría para que una LBM^{lo} progresara a LLC, superaría ampliamente la esperanza de vida actual de la población. De acuerdo con estos hallazgos, en ninguno de los dos estudios de seguimiento antes referidos, y llevados a cabo por otros autores, se había detectado evolución de LBM^{lo} a fases más avanzadas de la enfermedad, aunque en términos globales la duración del seguimiento o el número de casos en dichos estudios, eran significativamente inferiores a los nuestros.^{189,524,550}

Por lo tanto, nuestros hallazgos, aunque demuestran por primera vez, la evolución desde LBM^{lo} a LBM^{hi}, sugieren que la tasa de progresión sería muy baja, al menos a medio plazo. Aun así, seguimos sin conocer la relación precisa en lo que a los determinantes de progresión se refiere, entre la LBM^{lo} –que parece una condición relativamente estable–, la LBM^{hi} –que sí sería una condición pre-leucémica más evidente–, y la propia LLC. Para comprender mejor esta relación, sería necesario seguir profundizando en el estudio de otras características biológicas de las células B clonales (además de las alteraciones citogenéticas clásicas de la LLC), que pudieran ser responsables de la progresión de la enfermedad, desde el estadio de LBM^{lo}.

Estudios previos han demostrado la existencia de diferencias significativas en las secuencias del BCR en clones B con fenotipo LLC típico de sujetos con LBM^{lo} respecto a los

observados en la LBM^{hi} y en la LLC, tanto en lo que se refiere al uso de familias *IGHV/IGHD/IGHJ*, como en la frecuencia de receptores BCR estereotipados, y el estado mutacional de *IGHV*.^{500–502} Estas diferencias en las características del BCR de la LBM^{lo} vs. LBM^{hi} y LLC, asociadas a un mayor grado de oligo o multiclonalidad durante la etapa de LBM^{lo}, sugieren la existencia de un proceso de selección de aquellos clones LBM^{lo} que presentan BCRs con las características descritas en la LBM^{hi} y/o en la LLC, y consecuentemente, la posibilidad de que pudieran existir antígenos específicos comunes a ambas entidades (i.e. LBM y LLC). Estos antígenos serían responsables, por un lado, de la selección de la población clonal que se expandiría, y por otra parte, de la supervivencia y/o expansión de las células de esta misma población.

Un hallazgo inesperado de nuestro estudio fue el que, pese a la baja tasa de progresión a LBM^{hi}/LLC, los individuos con LBM^{lo} de nuestra cohorte original, especialmente las mujeres, tuvieron una supervivencia global significativamente más corta que la de los demás sujetos control de la población general (“LBM negativos”) de la misma edad, sexo y área geográfica de procedencia. Además, comprobamos que el impacto adverso sobre la supervivencia, de la presencia de clones LBM^{lo} era independiente de otras enfermedades responsables de la mayor parte de las muertes en la población general, como las enfermedades cardiovasculares y los tumores sólidos. Este hallazgo es especialmente sorprendente, si tenemos en cuenta que el grupo de la Clínica Mayo (Rochester, Minnesota) ha referido recientemente que los pacientes con LBM^{hi} no presentaban diferencias en la supervivencia global vs. controles sin LBM^{hi}, pese a que sí encontraron una mayor frecuencia de tumores e infecciones en estos pacientes en comparación con la observada en la población general.^{503,504,506} No obstante, cabe señalar que es muy posible que en el grupo control de dicho estudio, en realidad estén incluidos también muchos casos de LBM^{lo}, al haber aplicado para la definición del grupo control técnicas significativamente menos sensibles que la empleada en nuestra serie; esto podría contribuir a explicar, al menos en parte, las diferencias observadas con respecto a nuestros resultados. En cualquier caso, en contraposición con los hallazgos del grupo de la Clínica Mayo, y más en línea con nuestros hallazgos, merece destacar que el 12% de los individuos con LBM^{lo} de la cohorte del estudio italiano fallecieron en un periodo de 3 años,¹⁸⁹ y que 4 de los 11 individuos (36%) con LBM (dos individuos con LBM^{lo} y 9 con LBM^{hi} evaluados) de un estudio llevado a cabo por el

grupo de Shim et al., fallecieron también durante los ≈7 años de seguimiento realizado en este último trabajo.⁵⁵⁰

Además del mayor riesgo de muerte de los sujetos con LBM^{lo} frente a la población general de su misma edad y sexo, otro de los hallazgos llamativos de nuestro estudio fue el incremento significativo de la tasa de muerte por infecciones, muy superior a la observada por esta causa en la población general de la provincia de Salamanca de edad y sexo similares (21% vs. 1,4%); por el contrario, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la tasa de muerte por tumores o enfermedades cardiovasculares. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un gran paralelismo entre la LBM^{lo} y la LBM^{hi}/LLC, en el sentido de que en estos dos últimos grupos de pacientes se ha descrito una elevada frecuencia de tumores e infecciones, siendo estas últimas una de las principales causas de muerte en la LLC.^{273,274,276,552}

En conjunto, el incremento de la mortalidad en las LBM^{lo}, y en especial de la mortalidad por infecciones, apunta hacia la existencia ya en esta entidad de alteraciones del sistema inmune con consecuencias clínicas. Si bien desconocemos los mecanismos específicos responsables de la inmunodeficiencia que puede existir en sujetos con LBM^{lo}, en nuestra serie observamos un incremento significativo en el número absoluto de todas las poblaciones de linfocitos T (i.e. células T colaboradoras CD4⁺, y linfocitos T citotóxicos CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ y CD4⁻/CD8⁻) y células NK de SP, pero restringido a aquellos individuos en los que se produjo un aumento significativo del tamaño de la población clonal a los 7 años del estudio basal. Ante este hallazgo, caben dos posibilidades. Por un lado, podría existir un estímulo (de naturaleza actualmente desconocida) responsable de la emergencia/activación y posterior expansión de las células B clonales, y como consecuencia de ello, la activación de diferentes componentes de la respuesta inmune frente al clon linfóide B, provocando un cambio global en la distribución de las poblaciones leucocitarias, especialmente de las poblaciones linfoides T/NK; sin embargo, en principio parece poco probable que una población tan pequeña pueda conducir a un cambio tan significativo. Por otra parte, cabría la posibilidad de que, como consecuencia de la presencia de un determinado estímulo antigénico, se activaran poblaciones linfoides T/NK concretas con su consiguiente proliferación e incremento numérico en SP; esta activación T/NK podría generar un microambiente adecuado, que contribuyese a favorecer la supervivencia y expansión de la población linfóide B

clonal. En este contexto cabe señalar que, estudios previos han demostrado la presencia de diversas alteraciones funcionales en los linfocitos T de la LLC.^{184,274,284,291,292,295,296,298,300,553} A la vista de nuestros propios resultados en sujetos con LBM^{lo}, sería interesante llevar a cabo estudios funcionales para determinar si los linfocitos T incrementados ya en la fase de LBM^{lo} están alterados y en tal caso, si el tipo de alteración es similar a la descrita en la LLC.

En resumen, los primeros resultados de nuestro estudio demuestran que la LBM^{lo} es una entidad persistente y dinámica, en la que la mayor parte de los clones B aumentan significativamente su tamaño en sangre y adquieren alteraciones citogenéticas similares a las observadas en LBM^{hi} y la LLC, acompañándose de un aumento significativo de la mayoría de las poblaciones linfoides T y NK circulantes. Sin embargo, la probabilidad de progresión a LBM^{hi} o a LLC es extraordinariamente baja a medio plazo. A pesar de ello, la presencia de estas poblaciones clonales de origen desconocido, se asocia a un acortamiento significativo de la esperanza de vida, especialmente en las mujeres, debido a una mayor mortalidad por procesos infecciosos. Esta mayor tasa de mortalidad sugiere la existencia de una alteración del sistema inmune ya constatable en sujetos con LBM^{lo}, y que se agravaría con la progresión a LLC. Sería necesario, por tanto, determinar cuáles son las alteraciones específicas del sistema inmunológico y de la respuesta inmune en sujetos con LBM^{lo}, que permitan desentrañar los mecanismos responsables del aparente estado de inmunodeficiencia presente ya en esta etapa, en principio estable y (teóricamente) asintomática y/o premaligna de la enfermedad.

2.- Distribución de diferentes compartimentos de linfocitos B normales de sangre periférica en sujetos con LBM^{lo} versus LBM^{hi} y LLC

A raíz de los hallazgos referidos en el apartado anterior, y teniendo en cuenta además el progresivo deterioro del sistema inmune desde la etapa de LBM^{hi} hasta la LLC, el siguiente objetivo de este trabajo de tesis doctoral se centró en estudiar el estado del sistema inmune en sujetos con LBM^{lo}, LBM^{hi} y LLC vs. sujetos control de la misma edad y sexo, con un foco especial en el compartimento de las células B normales residuales de SP.

De todas las alteraciones inmunológicas descritas en pacientes con LLC, las alteraciones en la rama “humoral” de la respuesta inmune (especialmente la hipogammaglobulinemia) son las más frecuentes y mejor caracterizadas, y las que han demostrado tener una relación más

evidente con la morbi-mortalidad producida por infecciones.²⁷⁶ Aun así, hasta la fecha la información disponible acerca de la distribución de los linfocitos B normales de SP, responsables de las respuestas mediadas por anticuerpos, ya sea en sujetos con LBM o en pacientes con LLC, sigue siendo muy limitada. En este trabajo, constatamos la existencia de una reducción significativa en el número absoluto de linfocitos B normales residuales en SP de pacientes con LBM^{hi} y LLC en estadio Rai 0, fundamentalmente a expensas de las células B pre-CG (i.e. linfocitos B inmaduros y linfocitos B naive). Si tenemos en cuenta que el número de células B pre-CG es reflejo de la producción de linfocitos B en la MO, nuestros resultados sugieren la existencia de un déficit de producción medular de (nuevos) linfocitos B, desde la etapa de LBM^{hi}. A pesar de que en este estudio no se han identificado diferencias significativas en el número absoluto de las poblaciones pre-CG en LBM^{lo} con respecto a controles sanos no-LBM, en un estudio publicado anteriormente por nuestro grupo sí se observó una reducción significativa de células B inmaduras y naive en sujetos con LBM^{lo}, aunque no tan acusada como la descrita aquí para los pacientes con LBM^{hi} y LLC.⁵⁴⁹ Esta aparente discrepancia entre ambos estudios posiblemente se deba a que el número de casos incluidos en este último es menor (27 LBM^{lo} y 40 controles vs. 95 LBM^{lo} y 617 controles en el estudio anterior).⁵⁴⁹

No obstante lo anterior, el hallazgo de una reducción significativa en el número de linfocitos B pre-CG circulantes, sugiere que podría haber una infiltración progresiva de la MO por parte de los linfocitos B clonales, con la consiguiente afectación de la hematopoyesis, que ocurriría en etapas previas a la LLC Rai 0. Si esta hipótesis fuera cierta, deberían estar afectados preferentemente los nichos hematopoyéticos donde se producen los linfocitos B, ya que en ninguno de los sujetos incluidos en nuestro estudio se detectaron otras citopenias. Es importante destacar que la disminución en el número de células B pre-CG observado en sujetos con LBM y LLC no es debida a la edad, al haberse ajustado por edad las comparaciones con el grupo control.

La disminución progresiva de la producción de células pre-CG, podría llevar a una reducción paulatina del repertorio BCR de los linfocitos B naive, y por tanto, a una alteración (progresiva) de la capacidad de generar respuestas inmunológicas eficaces cuando el individuo contacte con nuevos patógenos o una parte de ellos. Ante esta situación, sería interesante poder analizar en profundidad en el futuro, el repertorio BCR de los linfocitos B (totales y pre-CG) de sujetos con LBM y LLC, con la finalidad de confirmar esta hipótesis.

A diferencia de lo descrito para las células B pre-CG, globalmente no se observaron diferencias significativas (vs. controles) en el número absoluto de las poblaciones linfoides B que ya han reconocido Ag (i.e. células B de memoria y células plasmáticas), la única excepción fue la de los sujetos con LBM^{hi}, en los que el número de CP circulantes estaba significativamente reducido respecto a los controles sanos. No obstante, cuando analizamos la distribución de los linfocitos B de memoria y de las CP en función de la subclase de Ig expresada por ambos grupos de células B, sí observamos que los individuos con LBM y LLC tenían una distribución diferente de la normal para dichas subpoblaciones B. Así, llamaba la atención la existencia de una reducción significativa en el número de CP IgM⁺ ya en sujetos con LBM^{lo}, lo cual apoyaría la existencia de alteraciones inmunológicas desde etapas muy anteriores al establecimiento de la LLC. Además, en los pacientes con LBM^{hi} se observó una reducción de todas las subpoblaciones de CP, independientemente del isotipo de Ig expresado (excepto de la población de CP IgG3⁺). Por el contrario, en la LLC, solo estaban disminuidas las subpoblaciones de CP IgG2⁺, IgG4⁺ e IgA2⁺, es decir, aquellas subpoblaciones de CP que expresan subclases de Ig codificadas en el tercer bloque de genes C, dentro del gen *IGHC*. Por lo que respecta a las células B de memoria, los individuos con LBM^{hi} mostraron una disminución del número absoluto de las subpoblaciones de memoria IgG3⁺ e IgG4⁺, mientras que en la LLC Rai 0 se encontraba reducido el número absoluto de células B de memoria IgG2⁺, IgG4⁺ e IgA2⁺, de manera análoga al patrón observado en las CP de estos mismos pacientes.

En principio, cabría esperar que como consecuencia de un proceso de deterioro progresivo de la respuesta inmune mediada por células B, el número de CP y de células B de memoria fuese más bajo en la LLC que en la LBM^{hi}. Sin embargo, nuestros resultados apuntan en la dirección contraria, de manera que es en la etapa de LBM^{hi} –y no en la LLC–, donde encontramos que prácticamente todas las poblaciones de CP están reducidas significativamente vs. el grupo control, y no solo las subpoblaciones IgG2⁺, IgG4⁺ e IgA2⁺, como ocurre en la LLC. Una posible explicación a este hallazgo es que en la LLC podría producirse una recuperación de las cifras de CP y linfocitos B de memoria, debida a una reactivación de la respuesta inmune frente a Ag dominantes en el ambiente y/o a Ag a los que nuestro sistema inmune está expuesto de manera crónica, como pueden ser autoantígenos o Ag procedentes de virus latentes de (re)exposición continuada (como CMV y VEB). Teniendo en cuenta que en la LLC el

compartimento B pre-CG está muy reducido, y probablemente muy restringido en su repertorio BCR, la aparente recuperación de la población de CP en pacientes con LLC solo sería cuantitativa, sin que suponga un incremento en la diversidad del repertorio. Esta hipótesis podría explicar también por qué el número de células B de memoria que expresan subclases correspondientes al segundo bloque de los genes C de *IGH* (i.e. IgG3, IgG1 e IgA1) se recupera en la LLC, ya que la mayor parte de las respuestas mediadas por linfocitos B frente a Ag proteicos –como son los virus latentes / crónicos anteriormente mencionados–, dependen de células que expresan los isotipos IgG1 e IgG3. En esta misma línea, actualmente sabemos que en la LLC los títulos de anticuerpos específicos frente a algunos virus latentes, como CMV, se mantienen constantes en el tiempo, a pesar de la disminución progresiva de los niveles globales de anticuerpos, asociada al agravamiento de la enfermedad.⁴²³

El estudio de los linfocitos B normales y sus subpoblaciones se completó con la determinación de su principal producto soluble, los anticuerpos (Ac). Como era de esperar, los pacientes con LLC Rai 0 mostraron una disminución significativa de los títulos solubles de Ac plasmáticos de los tres isotipos principales (i.e. IgM, IgG e IgA). Sin embargo, al analizar en más detalle las subclases de Ig responsables de la reducción en el título de Ac totales de tipo IgG e IgA, comprobamos que la disminución era fundamentalmente a expensas de las subclases IgG2, IgG4 e IgA2, respectivamente, es decir, de Igs codificadas por los genes C del tercer bloque del gen *IGHC*. La reducción intensa de los niveles de Ig observada en la LLC, sobre todo de los niveles solubles de IgG2, podría contribuir a explicar por qué las bacterias encapsuladas son los principales agentes etiológicos de las infecciones que padecen frecuentemente estos pacientes (sobre todo las infecciones del tracto respiratorio, generalmente producidas por *S.pneumoniae* y *H.influenzae*), ya que esta subclase de Ig es la principal responsable de la respuesta frente a Ag polisacáridicos, presentes en la pared bacteriana de los referidos patógenos.^{83,554} En contraposición con nuestros resultados, Freeman et al. observaron que la subclase de Ac más frecuentemente reducida en el plasma de los pacientes con LLC era la IgG3.⁵⁵⁵ Posiblemente, esta discrepancia pueda explicarse por diferencias en los valores utilizados para establecer el rango de la normalidad para cada subclase de Ac entre ambos estudios. No obstante esta discrepancia, otros trabajos⁵⁵⁶ están más en línea con nuestros hallazgos que con los referidos por Freeman et al.⁵⁵⁵

En resumen, el análisis detallado de las principales poblaciones de linfocitos B circulantes, incluidas las subpoblaciones de CP y linfocitos B de memoria que expresan diferentes subclases de Ig, pone de manifiesto la existencia de diferentes patrones de distribución de las distintas subpoblaciones B de SP en diferentes etapas de la enfermedad, desde la LBM^{lo} a la LLC. En conjunto, estas alteraciones apoyarían la existencia de una respuesta inmune B alterada, que tendría su origen ya en la etapa de LBM^{lo}, siendo mucho más evidente en la LBM^{hi} y la LLC.

3.- Respuesta inmune humoral específica frente a virus ubicuos de nuestro entorno y neumococo en LBM y LLC

Desde hace tiempo se conoce que la infección por ciertos virus está asociada al desarrollo de neoplasias hematológicas. En la mayoría de los casos en los que ha podido demostrarse de forma directa esta asociación, el patógeno induce la transformación oncogénica de la célula que infecta; tal es el caso del VEB, asociado con el linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt endémico y ciertos síndromes linfoproliferativos crónicos T y NK.³⁰¹⁻³⁰⁵ En otras hemopatías malignas, el papel oncogénico del agente infeccioso podría estar relacionado con la inducción de respuestas linfoides antígeno-específicas, que por motivos actualmente desconocidos, llevaría a expansiones de tipo clonal, como ocurre en la leucemia de linfocitos T granulares CD4⁺.⁵⁵⁷

En la LLC se han descrito algunos hallazgos que implicarían de manera indirecta a ciertos patógenos en la ontogenia de la enfermedad.^{418,422} Entre estos hallazgos se incluyen: i) la mayor seroprevalencia de CMV en pacientes con LLC, respecto a la población general;⁴²² ii) la existencia de títulos estables de anticuerpos específicos de CMV, pese a la disminución de los niveles plasmáticos de Ig solubles;⁴²³ y iii) la constatación de que ciertos BCR característicos de las células clonales de la LLC (e.g. *IGHV1-69 51p1*) sean capaces de reconocer y unirse de manera específica a un Ag concreto de CMV (pUL32).⁴¹⁸ Por otra parte, la recuperación del número absoluto de células plasmáticas circulantes desde la fase de LBM^{hi} a LLC aquí descrito, podría deberse también a una reactivación de la respuesta linfoide B frente a antígenos comunes / dominantes, incluidos los antígenos de virus ubicuos.

Por todo lo anteriormente expuesto, nuestro tercer objetivo se centró en el estudio de la respuesta humoral específica frente a un grupo de patógenos ubicuos en nuestro ambiente, con el fin de confirmar / descartar su posible implicación en la ontogenia de la LLC. Para ello, seleccionamos finalmente cuatro patógenos, que analizamos en cuatro grupos de sujetos ajustados por edad y sexo (controles no-LBM, LBM^{lo}, LBM^{hi} y LLC) y que incluían: CMV, VEB, virus de la gripe y *S.pneumoniae*.

Pese a la reducción progresiva de los niveles en plasma de IgM e IgG totales desde la LBM hasta los estadios más avanzados de la LLC, llamaba la atención que los niveles de anticuerpos específicos frente a CMV y al virus de la gripe (tanto de tipo IgM como IgG) eran similares en los cuatro grupos de estudio, a la vez que existían niveles progresivamente más elevados de IgG específica frente al Ag VCA del VEB, desde la LBM^{hi} hasta las formas más avanzadas de LLC (estadios Binet B/C). Estos resultados se traducen en que, a pesar de la situación de inmunodeficiencia humoral global que conduce a una progresiva pérdida de los niveles totales de inmunoglobulinas séricas, la respuesta mediada por anticuerpos frente a estos patógenos se encuentra mantenida (e incluso aumentada en el caso del VEB), en pacientes con LLC. Teniendo en cuenta la situación de hipogammaglobulinemia característica de cada grupo de estudio, calculamos la ratio entre anticuerpo específico de patógeno/anticuerpo total, para cada isotipo de Ig. Este análisis confirmó que, proporcionalmente, la respuesta humoral (niveles de anticuerpos) frente a CMV y VEB era significativamente superior en sujetos con LBM^{hi} y LLC vs. individuos sanos o con LBM^{lo}. Por otro lado, constatamos también que la respuesta humoral frente a un patógeno variaba en función del Ag específico investigado. Así, mientras que los niveles de IgG específica del Ag nuclear EBNA de VEB disminuían de manera progresiva con la progresión de la enfermedad, se observaba un patrón inverso para los niveles de anticuerpos frente al Ag VCA del mismo patógeno. Una posible explicación a esta aparente discrepancia, es la diferente función que tienen los distintos antígenos del VEB. Así, mientras que VCA es un Ag estructural de la cápside del virus, EBNA es un factor de transcripción necesario para la replicación del mismo;⁵⁵⁸ esto hace que el antígeno VCA forme parte de todas las partículas víricas, lo que supone un contacto continuo con los diferentes componentes del sistema inmune, independientemente de la fase del ciclo vital en la que el virus se encuentre, mientras que el antígeno EBNA solo está presente cuando se produce la activación del ciclo lítico del virus.⁵⁵⁸

A la vista de estos resultados, cabe preguntarse por qué los niveles de anticuerpos específicos frente a estos patógenos se mantienen en niveles habituales / normales, incluso en las formas más avanzadas de la enfermedad. Una posible hipótesis que explicaría estos hallazgos es que, al tratarse de virus latentes y extremadamente frecuentes en nuestro entorno, se producirían reactivaciones aprovechando el estado de inmunodeficiencia global del individuo. Al ser patógenos cuyo reservorio se encuentra en las propias células del organismo, especialmente en las células presentadoras de antígeno y sus precursores, el proceso de reactivación y la respuesta inmunológica consecuente serían continuas en el individuo, favoreciendo el contacto mantenido con linfocitos B de memoria y/o naive recién producidos, con una producción constante de anticuerpos específicos frente a estos patógenos. Esta respuesta inmunológica sería aparentemente eficiente, ya que los pacientes con LLC (no sometidos a tratamiento quimioterápico) tienen una frecuencia muy baja de reactivaciones por CMV o VEB clínicamente sintomáticas.^{438,559-561} Asimismo, cabe plantear que como consecuencia de estos procesos de reactivación de la respuesta inmune, que tendrían lugar ya desde la etapa de LBM^{hi}, las señales derivadas de las mismas pudieran favorecer la progresión del clon tumoral, mediante la generación de un micromedioambiente favorable para la activación, supervivencia y/o expansión de las células B, incluida la población B clonal. De acuerdo con esta hipótesis, la población de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺, cuya función principal es responder frente a este tipo de virus latentes crónicos (especialmente frente a CMV), se encuentra expandida en la mayoría de los pacientes con LLC. En este sentido, cabe la posibilidad de que estas células expandidas pudieran ser responsables, al menos en parte, de la generación de las señales inductoras del crecimiento / supervivencia tumoral, a través, por ejemplo, de la secreción de citocinas.⁵⁶²⁻⁵⁶⁵

Por otra parte, se ha sugerido que algunos virus crónicos como CMV, podrían tener también un papel relevante en la ontogenia de la LLC, debido a la mayor seroprevalencia de infección crónica por CMV observada en pacientes con LLC respecto a la población general.⁴²² Sin embargo, estos resultados no han podido ser confirmados en otras series de pacientes.⁴²² En nuestra serie, no encontramos diferencias significativas en la seroprevalencia de CMV o de VEB, entre pacientes con LLC y sujetos sanos de la población general del área geográfica de Salamanca, siendo la tasa de seroprevalencia para ambos virus de prácticamente el 100% en todos los grupos analizados.^{566,567} Globalmente, estos resultados, junto con datos previos de

otros trabajos, sugieren que muy probablemente no exista un único antígeno / patógeno responsable de la activación del BCR de las células clonales de la LLC, de manera que los estímulos antigénicos implicados serían de naturaleza y origen diverso.^{412,568}

A diferencia de lo expuesto para CMV, VEB y el virus de la gripe, los niveles de IgG específica frente a *S.pneumoniae* disminuyeron de manera progresiva desde la LBM^{hi} hasta las etapas más avanzadas de la LLC, en paralelo con la disminución de la IgG plasmática total. Estos resultados confirman la evidencia de una desprotección progresiva frente a *S.pneumoniae* en individuos con LBM y LLC, lo que les colocaría en riesgo de padecer infecciones respiratorias agudas y graves, como las neumonías por neumococo, relativamente frecuentes en pacientes con LLC. Es posible que este mismo patrón de desprotección ocurra frente a otras bacterias encapsuladas responsables de muchos procesos infecciosos descritos en sujetos con LBM^{hi} y pacientes de LLC (e.g. *S.aureus.*), aunque harían falta nuevos estudios para comprobarlo.

En su conjunto, los hallazgos referidos en este apartado del trabajo sugieren que, como consecuencia de la reactivación de la respuesta inmune frente a virus latentes, podrían generarse nuevas expansiones de células B de memoria y de CPs con especificidades concretas (repertorio BCR restringido) responsables del mantenimiento de los niveles séricos de anticuerpos frente a estos microorganismos, y de la aparente recuperación del número de CPs y linfocitos B de memoria observados en la transición de LBM^{hi} a LLC. Sin embargo, esta aparente recuperación cuantitativa de ambos compartimentos celulares, escondería una profunda remodelación del repertorio de ambas poblaciones, con una pérdida gradual de su diversidad en favor de dichos microorganismos dominantes, con la progresiva desprotección frente a un número cada vez mayor de patógenos.

A la vista de estos hallazgos, cabe plantearse en el futuro la necesidad (y posible efectividad) de potenciar la protección frente a patógenos concretos, a través de medidas de vacunación específicas frente a los mismos. En este contexto, varios estudios han demostrado que los pacientes con LLC responden de forma deficiente a la vacunación frente a *S.pneumoniae* o *H.influenzae*, incluso tras varias dosis de recuerdo.^{329,330,569-574} Esta baja eficiencia posiblemente sea debida a diferentes alteraciones que afectarían a distintos compartimentos de células del sistema inmune existentes en pacientes con LLC. Por este motivo, sería lógico pensar que un tratamiento profiláctico, desde las fases más tempranas de la enfermedad, e incluso antes

de que esta sea diagnosticada (por ejemplo, en la etapa de LBM), se asociaría con una mayor eficacia de la respuesta a vacunación, y por lo tanto, con una mayor protección frente a estos patógenos.

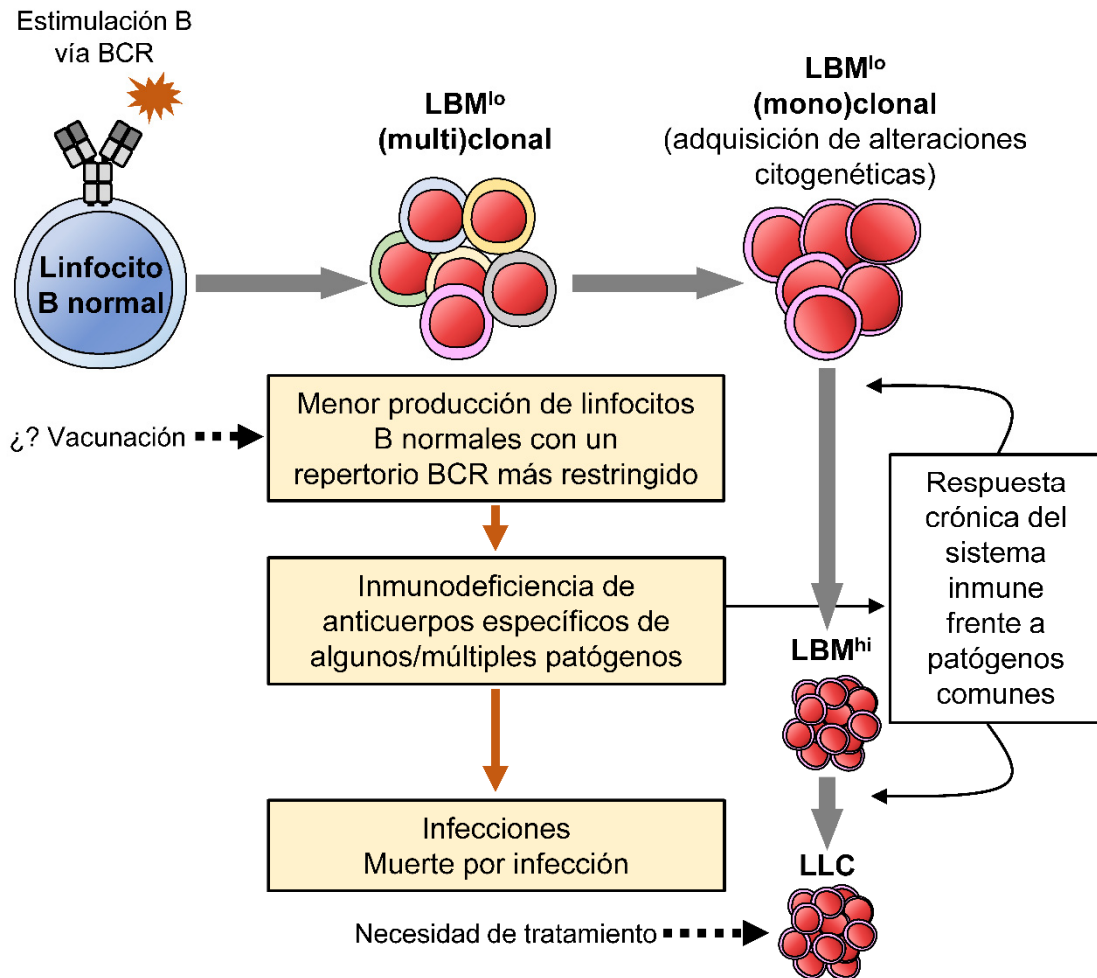
En resumen, nuestros resultados ponen de manifiesto el mantenimiento (e incluso aumento) de los niveles de anticuerpos específicos frente a CMV, VEB y virus de la gripe, tanto en la LBM^{hi} como en la LLC, pese a la caída progresiva global de los niveles de Igs séricas. Esta persistencia de los niveles de anticuerpos frente a patógenos concretos podría deberse a una reactivación mantenida, pero asintomática, de la respuesta frente a los mismos, lo cual podría a su vez contribuir a la generación de un micromedioambiente favorable para la supervivencia y expansión del clon B, y por lo tanto, facilitaría también la progresión de la enfermedad desde sus fases más tempranas. En el futuro, son necesarios estudios longitudinales en series más amplias, para poder confirmar el posible papel de estos patógenos en la progresión y transformación maligna de la enfermedad, y/o para establecer su posible utilidad como marcadores de progresión de la misma. En paralelo, existiría una desprotección progresiva y grave frente a *S.pneumoniae* (y probablemente también frente a muchos otros patógenos), que finalmente serían los responsables de la elevada morbi-mortalidad causada por infecciones tanto en sujetos con LBM como en pacientes con LLC, y frente a los que cabría plantear el posible beneficio de medidas dirigidas a potenciar la respuesta inmunológica, ya desde fases tempranas de la enfermedad.

4.- Modelo hipotético de ontogenia y expansión de las poblaciones linfoides B clonales que conducen a la LBM y la LLC

La activación normal de linfocitos B específicos de antígeno da lugar a pequeñas expansiones (oligo)clonales B. La persistencia de algunos estímulos antigénicos concretos, desconocidos por el momento, podría favorecer la supervivencia y/o expansión de algunas de estas poblaciones clonales. Su persistencia en el tiempo, unida a la adquisición progresiva de alteraciones genéticas típicas de la LLC, podría favorecer aún más si cabe su supervivencia. El aumento del número de estas células, aunque en cifras relativamente bajas, podría generar una inhibición competitiva de la producción de linfocitos B normales en médula ósea, con la consiguiente disminución del repertorio B, y la progresiva instauración de un estado de

inmunodeficiencia secundaria, de tipo humoral. Como consecuencia de todo ello, se produciría una pérdida progresiva de la respuesta inmune mediada por linfocitos B, frente a distintos patógenos, reflejada en una hipogammaglobulinemia progresiva, que se agrava aún más al progresar la enfermedad.

Figura 5 | Esquema ilustrativo del modelo secuencial de desarrollo y expansión de poblaciones de linfocitos B clonales en la LBM y la LLC planteada según los resultados de este trabajo.



En este contexto, la producción residual de anticuerpos quedaría enfocada, e incluso restringida, a las respuestas frente a patógenos comunes del medio; estos al estar presentes de forma constante en el organismo, podrían inducir con mayor probabilidad una respuesta inmune mediada por células B naive, una vez se haya agotado la memoria inmunológica frente a los mismos. Esto conllevaría un incremento (relativo) de los títulos de anticuerpos específicos frente a estos microorganismos, asociado a niveles progresivamente más bajos de anticuerpos frente a otros patógenos, poniendo al individuo en riesgo de padecer infecciones graves. Asimismo, la

respuesta B mantenida (cronificada) frente a estos patógenos habituales podría proporcionar las señales requeridas por los (pequeños) clones de linfocitos B tumorales, portadores ya de alteraciones genéticas típicas de las fases más avanzadas de la enfermedad, para proliferar e incrementar su número en el organismo, con la posterior transformación maligna de la enfermedad.

Conclusiones

En relación con el primer objetivo, centrado en determinar la tasa de persistencia y la cinética de las poblaciones linfoides B clonales presentes en SP de sujetos con LBM^{lo}, así como su impacto clínico a medio plazo:

1. La LBM^{lo} es una entidad persistente en el tiempo dado que, tras una mediana de seguimiento de 7 años, en todos los individuos analizados persistían en la circulación las pequeñas poblaciones de linfocitos B clonales con características fenotípicas idénticas a las detectadas en el estudio basal.
2. Las poblaciones de linfocitos B clonales con fenotipo de tipo LLC de sujetos con LBM^{lo}, presentan características biológicas muy dinámicas, asociadas en la mayoría de los casos a un aumento de tamaño y a la adquisición progresiva de nuevas alteraciones genéticas características de LLC de buen pronóstico.
3. Aunque la tasa de progresión de LBM^{lo} a LBM^{hi} o LLC es a medio plazo extraordinariamente baja, todo parece indicar que esta entidad constituiría la primera fase de desarrollo de la enfermedad, sin que por el momento hayamos podido identificar las características clínicas y/o biológicas asociadas a la transformación maligna.
4. Los sujetos con LBM^{lo}, especialmente las mujeres, tienen una supervivencia significativamente más corta que la de la población general de la misma edad, sexo y área geográfica de procedencia, debido a una mayor mortalidad por infecciones. Estos hallazgos sugieren que, ya en las etapas más tempranas de desarrollo de la LLC podría existir una alteración de la respuesta inmune, potencialmente relacionada con la expansión de los pequeños clones de linfocitos B tumorales.

En relación con el segundo objetivo, que perseguía evaluar la distribución de las subpoblaciones de linfocitos B normales en SP y los niveles de Igs plasmáticas en la LBM^{lo} respecto tanto a adultos sanos sin LBM como a pacientes con LBM^{hi} y LLC:

5. Existe una alteración importante de la distribución de las principales poblaciones de linfocitos B normales residuales de sangre periférica en pacientes con LBM^{hi} y LLC, siendo dicha alteración debida fundamentalmente a una reducción significativa del número de linfocitos B inmaduros y naive, lo que generaría un repertorio B más restringido.
6. Aunque globalmente no se observa una alteración del número de células plasmáticas y de linfocitos B de memoria en la SP de sujetos con LBM y LLC, un análisis más detallado muestra una alteración cualitativa y progresiva de ambos compartimientos celulares. Así, se observa una reducción significativa de las CPs IgM⁺ en la LBM^{lo}, seguido de una disminución de CPs de todos los isotipos de Ig en la LBM^{hi}, y de un déficit específico de CPs y linfocitos B de memoria que expresan subclases de Ig codificadas en el tercer bloque de genes *IGHC* (IgG2, IgG4, IgA2) entre pacientes con LLC.

En relación con el tercer objetivo, centrado en evaluar la respuesta humoral específica frente a patógenos comunes de nuestro medio y a neumococo, en sujetos con LBM^{lo} frente a adultos sin LBM y pacientes con LBM^{hi} y LLC:

7. Los títulos específicos de anticuerpos frente a virus latentes (como CMV o VEB) se encuentran proporcionalmente más representados en la LBM^{hi} y la LLC que en donantes sanos y/o la LBM^{lo}, lo que podría reflejar un mayor grado de reactivación de la respuesta inmune frente a estos patógenos, a medida que avanza la enfermedad.
8. A diferencia de lo que ocurre en CMV y VEB, los títulos de anticuerpos específicos frente a neumococo disminuyen de manera progresiva desde la LBM^{lo} hasta las fases más avanzadas de la LLC, lo que podría contribuir a explicar el estado de inmunodeficiencia secundaria acusada frente a este patógeno, y el mayor riesgo de infecciones respiratorias graves, observadas en pacientes con LBM y LLC.

Referencias bibliográficas

- 1 Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* 2012; **10**: 120–136.
- 2 Hardy RR, Hayakawa K. A developmental switch in B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 11550–11554.
- 3 LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008; **112**: 1570–1580.
- 4 Allen CDC, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007; **27**: 190–202.
- 5 Matarraz S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores J *et al*. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008; **22**: 1175–1183.
- 6 Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997; **91**: 661–672.
- 7 Izon D, Rudd K, DeMuth W, Pear WS, Clendenin C, Lindsley RC *et al*. A common pathway for dendritic cell and early B cell development. *J Immunol* 2001; **167**: 1387–1392.
- 8 Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 107–116.
- 9 Nutt SL, Kee BL. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 2007; **26**: 715–725.
- 10 Zandi S, Bryder D, Sigvardsson M. Load and lock: the molecular mechanisms of B-lymphocyte commitment. *Immunol Rev* 2010; **238**: 47–62.
- 11 Yu VWC, Scadden DT. Heterogeneity of the bone marrow niche. *Curr Opin Hematol* 2016; **23**: 331–338.
- 12 Asada N, Takeishi S, Frenette PS. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Int J Hematol* 2017; **106**: 45–54.
- 13 Melchers F, Strasser A, Bauer SR, Kudo A, Thalmann P, Rolink A. B cell development in fetal liver. *Adv Exp Med Biol* 1991; **292**: 201–205.
- 14 Melchers F, ten Boekel E, Seidl T, Kong XC, Yamagami T, Onishi K *et al*. Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol Rev* 2000; **175**: 33–46.
- 15 Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998; **91**: 1101–1134.
- 16 Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 1999; **10**: 463–471.
- 17 Carsetti R. The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *J Exp Med* 2000; **191**: 5–8.
- 18 Egawa T, Kawabata K, Kawamoto H, Amada K, Okamoto R, Fujii N *et al*. The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity* 2001; **15**: 323–334.
- 19 Baker SJ, Reddy EP. B cell differentiation: role of E2A and Pax5/BSAP transcription factors. *Oncogene* 1995; **11**: 413–426.
- 20 Bain G, Maandag EC, Izon DJ, Amsen D, Kruisbeek AM, Weintraub BC *et al*. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 1994; **79**: 885–

- 892.
- 21 Desiderio S. Lymphopoiesis. Transcription factors controlling B-cell development. *Curr Biol* 1995; **5**: 605–608.
- 22 O’Riordan M, Grosschedl R. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* 1999; **11**: 21–31.
- 23 Lewis SM. The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol* 1994; **56**: 27–150.
- 24 van Zelm MC, van der Burg M, de Ridder D, Barendregt BH, de Haas EFE, Reinders MJT *et al.* Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. *J Immunol* 2005; **175**: 5912–5922.
- 25 Roth DB. V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiol Spectr* 2014; **2**. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0041-2014.
- 26 Zhang M, Srivastava G, Lu L. The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cell Mol Immunol* 2004; **1**: 89–94.
- 27 Espeli M, Rossi B, Mancini SJC, Roche P, Gauthier L, Schiff C. Initiation of pre-B cell receptor signaling: common and distinctive features in human and mouse. *Semin Immunol* 2006; **18**: 56–66.
- 28 Pelayo R, Welner RS, Nagai Y, Kincade PW. Life before the pre-B cell receptor checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Semin Immunol* 2006; **18**: 2–11.
- 29 Hess J, Werner A, Wirth T, Melchers F, Jack HM, Winkler TH. Induction of pre-B cell proliferation after de novo synthesis of the pre-B cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 1745–1750.
- 30 Loffert D, Ehlich A, Muller W, Rajewsky K. Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development. *Immunity* 1996; **4**: 133–144.
- 31 Melchers F. Fit for life in the immune system? Surrogate L chain tests H chains that test L chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 2571–2573.
- 32 Radic MZ, Zouali M. Receptor editing, immune diversification, and self-tolerance. *Immunity* 1996; **5**: 505–511.
- 33 Sandel PC, Monroe JG. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* 1999; **10**: 289–299.
- 34 Pelanda R, Torres RM. Central B-cell tolerance: where selection begins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; **4**: a007146.
- 35 Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* 2017; **17**: 281–294.
- 36 Lang J, Ota T, Kelly M, Strauch P, Freed BM, Torres RM *et al.* Receptor editing and genetic variability in human autoreactive B cells. *J Exp Med* 2016; **213**: 93–108.
- 37 Blanco E, Pérez-Andrés M, Arriba-Méndez S, Contreras-Sanfeliciano T, Criado I, Pelak O *et al.* Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 2018; : en prensa desde 2 marzo 2018; 10.1016/j.jaci.2018.
- 38 Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J *et al.* Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; **78B**: S47–S60.
- 39 Cyster JG. B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat Immunol* 2010; **11**: 989–996.

- 40 Garside P, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 1998; **281**: 96–99.
- 41 Coffey F, Alabyev B, Manser T. Initial clonal expansion of germinal center B cells takes place at the perimeter of follicles. *Immunity* 2009; **30**: 599–609.
- 42 Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 2012; **30**: 429–457.
- 43 Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* 2016; **45**: 471–482.
- 44 Suan D, Krautler NJ, Maag JL V, Butt D, Bourne K, Hermes JR *et al.* CCR6 Defines Memory B Cell Precursors in Mouse and Human Germinal Centers, Revealing Light-Zone Location and Predominant Low Antigen Affinity. *Immunity* 2017; **47**: 1142–1153.
- 45 Schwickert TA, Lindquist RL, Shakhhar G, Livshits G, Skokos D, Kosco-Vilbois MH *et al.* In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* 2007; **446**: 83–87.
- 46 McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 487–513.
- 47 Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML *et al.* Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 2010; **143**: 592–605.
- 48 Meyer-Hermann M, Mohr E, Pelletier N, Zhang Y, Victora GD, Toellner K-M. A theory of germinal center B cell selection, division, and exit. *Cell Rep* 2012; **2**: 162–174.
- 49 Garin A, Meyer-Hermann M, Contie M, Figge MT, Buatois V, Gunzer M *et al.* Toll-like receptor 4 signaling by follicular dendritic cells is pivotal for germinal center onset and affinity maturation. *Immunity* 2010; **33**: 84–95.
- 50 Heesters BA, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* 2014; **14**: 495–504.
- 51 Khalil AM, Cambier JC, Shlomchik MJ. B cell receptor signal transduction in the GC is short-circuited by high phosphatase activity. *Science* 2012; **336**: 1178–1181.
- 52 Mueller J, Matloubian M, Zikherman J. Cutting edge: An in vivo reporter reveals active B cell receptor signaling in the germinal center. *J Immunol* 2015; **194**: 2993–2997.
- 53 Klein U, Casola S, Cattoretti G, Shen Q, Lia M, Mo T *et al.* Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 2006; **7**: 773–782.
- 54 Teng Y, Takahashi Y, Yamada M, Kurosu T, Koyama T, Miura O *et al.* IRF4 negatively regulates proliferation of germinal center B cell-derived Burkitt's lymphoma cell lines and induces differentiation toward plasma cells. *Eur J Cell Biol* 2007; **86**: 581–589.
- 55 Ochiai K, Maienschein-Cline M, Simonetti G, Chen J, Rosenthal R, Brink R *et al.* Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity* 2013; **38**: 918–929.
- 56 Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 2015; **15**: 160–171.
- 57 Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 2007; **8**: 463–470.
- 58 Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravallesse EM *et al.* Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*

- 2001; **412**: 300–307.
- 59 Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee A-H, Qian S-B, Zhao H *et al.* XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 2004; **21**: 81–93.
- 60 Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M *et al.* Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat Immunol* 2016; **17**: 861–869.
- 61 Elgueta R, Marks E, Nowak E, Menezes S, Benson M, Raman VS *et al.* CCR6-dependent positioning of memory B cells is essential for their ability to mount a recall response to antigen. *J Immunol* 2015; **194**: 505–513.
- 62 Chiu Y-K, Lin I-Y, Su S-T, Wang K-H, Yang S-Y, Tsai D-Y *et al.* Transcription factor ABF-1 suppresses plasma cell differentiation but facilitates memory B cell formation. *J Immunol* 2014; **193**: 2207–2217.
- 63 Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM *et al.* Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica* 2010; **95**: 1016–1020.
- 64 Mei HE, Yoshida T, Sime W, Hiepe F, Thiele K, Manz RA *et al.* Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood* 2009; **113**: 2461–2469.
- 65 Moser K, Muehlinghaus G, Manz R, Mei H, Voigt C, Yoshida T *et al.* Long-lived plasma cells in immunity and immunopathology. *Immunol Lett* 2006; **103**: 83–85.
- 66 Moser K, Tokoyoda K, Radbruch A, MacLennan I, Manz RA. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* 2006; **18**: 265–270.
- 67 Sundstrom P, Lundin SB, Nilsson L-A, Quiding-Jarbrink M. Human IgA-secreting cells induced by intestinal, but not systemic, immunization respond to CCL25 (TECK) and CCL28 (MEC). *Eur J Immunol* 2008; **38**: 3327–3338.
- 68 Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; **188**: 1679–1689.
- 69 Tangye SG, Liu YJ, Aversa G, Phillips JH, de Vries JE. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* 1998; **188**: 1691–1703.
- 70 Blanco E, Perez-Andres M, Sanoja-Flores L, Wentink M, Pelak O, Martín-Ayuso M *et al.* Selection and validation of antibody clones against IgG and IgA subclasses in switched memory B-cells and plasma cells. *J Immunol Methods* 2017. doi:10.1016/j.jim.2017.09.008.
- 71 Weiser AA, Wittenbrink N, Zhang L, Schmelzer AI, Valai A, Or-Guil M. Affinity maturation of B cells involves not only a few but a whole spectrum of relevant mutations. *Int Immunol* 2011; **23**: 345–356.
- 72 van der Vuurst de Vries AR, Clevers H, Logtenberg T, Meyaard L. Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 3160–3167.
- 73 Pritchard NR, Smith KGC. B cell inhibitory receptors and autoimmunity. *Immunology* 2003; **108**: 263–273.
- 74 Fecteau JF, Neron S. CD40

- stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol* 2003; **171**: 4621–4629.
- 75 Yamazaki T, Nagumo H, Hayashi T, Sugane K, Agematsu K. CD72-mediated suppression of human naive B cell differentiation by down-regulating X-box binding protein 1. *Eur J Immunol* 2005; **35**: 2325–2334.
- 76 Good KL, Avery DT, Tangye SG. Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol* 2009; **182**: 890–901.
- 77 Berkowska MA, Heeringa JJ, Hajdarbegovic E, van der Burg M, Thio HB, van Hagen PM *et al*. Human IgE(+) B cells are derived from T cell-dependent and T cell-independent pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **134**: 688–697.e6.
- 78 Berkowska MA, Driessen GJA, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A *et al*. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 2011; **118**: 2150–2158.
- 79 Bruggemann M, Williams GT, Bindon CI, Clark MR, Walker MR, Jefferis R *et al*. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med* 1987; **166**: 1351–1361.
- 80 Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 2014; **5**: 520.
- 81 Irani V, Guy AJ, Andrew D, Beeson JG, Ramsland PA, Richards JS. Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Mol Immunol* 2015; **67**: 171–182.
- 82 Barrett DJ, Ayoub EM. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin Exp Immunol*. 1986; **63**: 127–134.
- 83 Chudwin DS, Artrip SG, Schiffman G. Immunoglobulin G class and subclass antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; **44**: 114–121.
- 84 Rynnel-Dagoo B, Freijd A, Prellner K. Antibody activity of IgG subclasses against pneumococcal polysaccharides after vaccination. *Am J Otolaryngol* 1985; **6**: 275–279.
- 85 Kapur R, Einarsdottir HK, Vidarsson G. IgG-effector functions: ‘the good, the bad and the ugly’. *Immunol Lett* 2014; **160**: 139–144.
- 86 Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy* 2009; **39**: 469–477.
- 87 James LK, Till SJ. Potential Mechanisms for IgG4 Inhibition of Immediate Hypersensitivity Reactions. *Curr Allergy Asthma Rep* 2016; **16**: 23 <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0600-2>.
- 88 Redpath S, Michaelsen T, Sandlie I, Clark MR. Activation of complement by human IgG1 and human IgG3 antibodies against the human leucocyte antigen CD52. *Immunology*. 1998; **93**: 595–600.
- 89 Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol* 2011; **4**: 590–597.
- 90 Bakema JE, van Egmond M. The human immunoglobulin A Fc receptor FcαRI: a multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal Immunol* 2011; **4**: 612–624.
- 91 Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE. Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annu Rev Immunol*. 2008; **26**: 261–292.
- 92 Stavnezer J, Schrader CE. IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J*

- Immunol* 2014; **193**: 5370–5378.
- 93 Vercelli D, Geha RS. Regulation of isotype switching. *Curr Opin Immunol* 1992; **4**: 794–797.
- 94 Gritzmacher CA. Molecular aspects of heavy-chain class switching. *Crit Rev Immunol* 1989; **9**: 173–200.
- 95 Sakai E, Bottaro A, Alt FW. The Ig heavy chain intronic enhancer core region is necessary and sufficient to promote efficient class switch recombination. *Int Immunol* 1999; **11**: 1709–1713.
- 96 Shanmugam A, Shi MJ, Yauch L, Stavnezer J, Kenter AL. Evidence for class-specific factors in immunoglobulin isotype switching. *J Exp Med* 2000; **191**: 1365–1380.
- 97 Collins AM, Jackson KJL. A Temporal Model of Human IgE and IgG Antibody Function. *Front Immunol* 2013; **4**: 235.
- 98 Jackson KJL, Wang Y, Collins AM. Human immunoglobulin classes and subclasses show variability in VDJ gene mutation levels. *Immunol Cell Biol* 2014; **92**: 729–733.
- 99 van Zelm MC. B cells take their time: sequential IgG class switching over the course of an immune response? *Immunol Cell Biol* 2014; **92**: 645–646.
- 100 de Jong BG, IJspeert H, Marques L, van der Burg M, van Dongen JJ, Loos BG *et al.* Human IgG2- and IgG4-expressing memory B cells display enhanced molecular and phenotypic signs of maturity and accumulate with age. *Immunol Cell Biol* 2017; **95**: 744–752.
- 101 Lam KP, Kuhn R, Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 1997; **90**: 1073–1083.
- 102 Kraus M, Alimzhanov MB, Rajewsky N, Rajewsky K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* 2004; **117**: 787–800.
- 103 Rickert RC. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**: 578–591.
- 104 Ackermann JA, Nys J, Schweighoffer E, McCleary S, Smithers N, Tybulewicz VLJ. Syk tyrosine kinase is critical for B cell antibody responses and memory B cell survival. *J Immunol* 2015; **194**: 4650–4656.
- 105 Kurosaki T. Regulation of BCR signaling. *Mol Immunol* 2011; **48**: 1287–1291.
- 106 Shinohara H, Kurosaki T. Genetic analysis of B cell signaling. *Subcell Biochem* 2006; **40**: 145–187.
- 107 Gazumyan A, Reichlin A, Nussenzweig MC. Ig beta tyrosine residues contribute to the control of B cell receptor signaling by regulating receptor internalization. *J Exp Med* 2006; **203**: 1785–1794.
- 108 Roskoski RJ. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **324**: 1155–1164.
- 109 Ulivieri C, Baldari CT. The BCR signalosome: where cell fate is decided. *J Biol Regul Homeost Agents* 2005; **19**: 1–16.
- 110 Timmerman LA, Healy JI, Ho SN, Chen L, Goodnow CC, Crabtree GR. Redundant expression but selective utilization of nuclear factor of activated T cells family members. *J Immunol* 1997; **159**: 2735–2740.
- 111 Sugawara H, Kurosaki M, Takata M, Kurosaki T. Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J* 1997; **16**: 3078–3088.
- 112 Hashimoto A, Okada H, Jiang A, Kurosaki M, Greenberg S, Clark EA *et al.* Involvement of guanosine triphosphatases and phospholipase C-gamma2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase, and p38 mitogen-activated

- protein kinase activation by the B cell antigen receptor. *J Exp Med* 1998; **188**: 1287–1295.
- 113 Oh-hora M, Johmura S, Hashimoto A, Hikida M, Kurosaki T. Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C-gamma2 to Ras in B cell receptor signaling. *J Exp Med* 2003; **198**: 1841–1851.
- 114 Hikida M, Kurosaki T. Regulation of phospholipase C-gamma2 networks in B lymphocytes. *Adv Immunol* 2005; **88**: 73–96.
- 115 Myers DR, Zikherman J, Roose JP. Tonic Signals: Why Do Lymphocytes Bother? *Trends Immunol* 2017; **38**: 844–857.
- 116 Fearon DT, Carter RH. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; **13**: 127–149.
- 117 Metzler G, Kolhatkar NS, Rawlings DJ. BCR and co-receptor crosstalk facilitate the positive selection of self-reactive transitional B cells. *Curr Opin Immunol*. 2015; **37**: 46–53.
- 118 Sato S, Jansen PJ, Tedder TF. CD19 and CD22 expression reciprocally regulates tyrosine phosphorylation of Vav protein during B lymphocyte signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 13158–13162.
- 119 Carter RH, Wang Y, Brooks S. Role of CD19 signal transduction in B cell biology. *Immunol Res* 2002; **26**: 45–54.
- 120 Fujimoto M, Poe JC, Jansen PJ, Sato S, Tedder TF. CD19 amplifies B lymphocyte signal transduction by regulating Src-family protein tyrosine kinase activation. *J Immunol* 1999; **162**: 7088–7094.
- 121 Tuveson DA, Carter RH, Soltoff SP, Fearon DT. CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase. *Science* 1993; **260**: 986–989.
- 122 Weng WK, Jarvis L, LeBien TW. Signaling through CD19 activates Vav/mitogen-activated protein kinase pathway and induces formation of a CD19/Vav/phosphatidylinositol 3-kinase complex in human B cell precursors. *J Biol Chem* 1994; **269**: 32514–32521.
- 123 Li X, Sandoval D, Freeberg L, Carter RH. Role of CD19 tyrosine 391 in synergistic activation of B lymphocytes by coligation of CD19 and membrane Ig. *J Immunol* 1997; **158**: 5649–5657.
- 124 O'Rourke LM, Tooze R, Turner M, Sandoval DM, Carter RH, Tybulewicz VL *et al*. CD19 as a membrane-anchored adaptor protein of B lymphocytes: costimulation of lipid and protein kinases by recruitment of Vav. *Immunity* 1998; **8**: 635–645.
- 125 Brooks SR, Li X, Volanakis EJ, Carter RH. Systematic analysis of the role of CD19 cytoplasmic tyrosines in enhancement of activation in Daudi human B cells: clustering of phospholipase C and Vav and of Grb2 and Sos with different CD19 tyrosines. *J Immunol* 2000; **164**: 3123–3131.
- 126 Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 1992; **256**: 105–107.
- 127 Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B, Tedder TF. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* 1995; **3**: 39–50.
- 128 Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 1996; **271**: 348–350.
- 129 van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castano D, van Noesel CJM, van Tol MJD *et al*. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med* 2006; **354**: 1901–1912.

- 130 van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandené L, Janssen F *et al.* CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J. Clin. Invest.* 2010; **120**: 1265–1274.
- 131 Thiel J, Kimmig L, Salzer U, Grudzien M, Lebrecht D, Hagena T *et al.* Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**: 801–810.e6.
- 132 Wentink MWJ, Lambeck AJA, van Zelm MC, Simons E, van Dongen JJM, IJspeert H *et al.* CD21 and CD19 deficiency: Two defects in the same complex leading to different disease modalities. *Clin Immunol* 2015; **161**: 120–127.
- 133 Vences-Catalan F, Kuo C-C, Sagi Y, Chen H, Kela-Madar N, van Zelm MC *et al.* A mutation in the human tetraspanin CD81 gene is expressed as a truncated protein but does not enable CD19 maturation and cell surface expression. *J Clin Immunol* 2015; **35**: 254–263.
- 134 Sen G, Bikah G, Venkataraman C, Bondada S. Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 3319–3328.
- 135 Perez-Villar JJ, Whitney GS, Bowen MA, Hewgill DH, Aruffo AA, Kanner SB. CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2903–2912.
- 136 Gary-Gouy H, Harriague J, Dalloul A, Donnadiou E, Bismuth G. CD5-negative regulation of B cell receptor signaling pathways originates from tyrosine residue Y429 outside an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* 2002; **168**: 232–239.
- 137 Tarakhovskiy A, Kanner SB, Hombach J, Ledbetter JA, Muller W, Killeen N *et al.* A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 1995; **269**: 535–537.
- 138 Hippen KL, Tze LE, Behrens TW. CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J Exp Med* 2000; **191**: 883–890.
- 139 Kelm S, Pelz A, Schauer R, Filbin MT, Tang S, de Bellard ME *et al.* Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr Biol* 1994; **4**: 965–972.
- 140 Nitschke L, Carsetti R, Ocker B, Kohler G, Lamers MC. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* 1997; **7**: 133–143.
- 141 Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 255–266.
- 142 Doody GM, Justement LB, Delibrias CC, Matthews RJ, Lin J, Thomas ML *et al.* A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* 1995; **269**: 242–244.
- 143 Lankester AC, van Schijndel GM, van Lier RA. Hematopoietic cell phosphatase is recruited to CD22 following B cell antigen receptor ligation. *J Biol Chem* 1995; **270**: 20305–20308.
- 144 Fujimoto M, Bradney AP, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. Modulation of B lymphocyte antigen receptor signal transduction by a CD19/CD22 regulatory loop. *Immunity* 1999; **11**: 191–200.
- 145 Hoffmann A, Kerr S, Jellusova J, Zhang J, Weisel F, Wellmann U *et al.* Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population. *Nat Immunol* 2007; **8**: 695–704.
- 146 Meyaard L, Adema GJ, Chang C, Woollatt E, Sutherland GR, Lanier LL

- et al.* LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity* 1997; **7**: 283–290.
- 147 Poggi A, Tomasello E, Ferrero E, Zocchi MR, Moretta L. p40/LAIR-1 regulates the differentiation of peripheral blood precursors to dendritic cells induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 2086–2091.
- 148 Verbrugge A, de Ruyter T, Geest C, Coffier PJ, Meyaard L. Differential expression of leukocyte-associated Ig-like receptor-1 during neutrophil differentiation and activation. *J Leukoc Biol* 2006; **79**: 828–836.
- 149 Florian S, Sonneck K, Czerny M, Hennesdorf F, Hauswirth AW, Buhning H-J *et al.* Detection of novel leukocyte differentiation antigens on basophils and mast cells by HLDA8 antibodies. *Allergy* 2006; **61**: 1054–1062.
- 150 Meyaard L. The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). *J Leukoc Biol* 2008; **83**: 799–803.
- 151 Tang X, Tian L, Estes G, Choi S-C, Barrow AD, Colonna M *et al.* Leukocyte-associated Ig-like receptor-1-deficient mice have an altered immune cell phenotype. *J Immunol* 2012; **188**: 548–558.
- 152 Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 2009; **229**: 152–172.
- 153 van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 2–17.
- 154 Bretscher PA. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 185–190.
- 155 Danese S, Sans M, Fiocchi C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; **53**: 1035–1043.
- 156 Bishop GA, Moore CR, Xie P, Stunz LL, Kraus ZJ. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv Exp Med Biol* 2007; **597**: 131–151.
- 157 Pullen SS, Labadia ME, Ingraham RH, McWhirter SM, Everdeen DS, Alber T *et al.* High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry* 1999; **38**: 10168–10177.
- 158 Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, Just U. The Notch signaling pathway: molecular basis of cell context dependency. *Eur J Cell Biol* 2011; **90**: 572–581.
- 159 He Y, Pear WS. Notch signalling in B cells. *Semin Cell Dev Biol* 2003; **14**: 135–142.
- 160 Bertrand FE, Eckfeldt CE, Lysholm AS, LeBien TW. Notch-1 and Notch-2 exhibit unique patterns of expression in human B-lineage cells. *Leukemia* 2000; **14**: 2095–2102.
- 161 Allman D, Karnell FG, Punt JA, Bakkour S, Xu L, Myung P *et al.* Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. *J Exp Med* 2001; **194**: 99–106.
- 162 Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C *et al.* Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004; **306**: 269–271.
- 163 Weng AP, Nam Y, Wolfe MS, Pear WS, Griffin JD, Blacklow SC *et al.* Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 655–664.
- 164 Hubmann R, Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M, Duechler M, Dettke M *et al.* Notch2 is involved in the overexpression of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; **99**: 3742–3747.
- 165 Kawasaki T, Kawai T. Toll-Like

- Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* 2014; **5**: 461.
- 166 Buchta CM, Bishop GA. Toll-like receptors and B cells: functions and mechanisms. *Immunol Res* 2014; **59**: 12–22.
- 167 Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003; **300**: 1524–1525.
- 168 Gerondakis S, Grumont RJ, Banerjee A. Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. *Immunol Cell Biol* 2007; **85**: 471–475.
- 169 Schweighoffer E, Nys J, Vanes L, Smithers N, Tybulewicz VLJ. TLR4 signals in B lymphocytes are transduced via the B cell antigen receptor and SYK. *J Exp Med* 2017; **214**: 1269–1280.
- 170 Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol* 2006; **36**: 810–816.
- 171 Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, Kay N *et al.* Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 2005; **130**: 325–332.
- 172 Kalpadakis C, Pangalis GA, Sachanas S, Vassilakopoulos TP, Kyriakaki S, Korkolopoulou P *et al.* New insights into monoclonal B-cell lymphocytosis. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 258917.
- 173 Karube K, Scarfo L, Campo E, Ghia P. Monoclonal B cell lymphocytosis and 'in situ' lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2014; **24**: 3–14.
- 174 Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia* 2010; **24**: 512–20.
- 175 D'Arena G, Musto P. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Transl Med @ UniSa* 2014; **8**: 75–79.
- 176 Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton JAL, Evans PAS *et al.* Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of 'indolent' chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood* 2002; **100**: 635–639.
- 177 Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, Lopez A, Henriques AF *et al.* Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 2009; **114**: 33–37.
- 178 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: *WHO Classification of Tumours*. IARC: Lyon (Francia), 2008.
- 179 Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; **127**: 2375–90.
- 180 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *et al.* *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. IARC: Lyon (Francia), 2017.
- 181 Rawstron AC, Shanafelt T, Lanasa MC, Landgren O, Hanson C, Orfao A *et al.* Different biology and clinical outcome according to the absolute numbers of clonal B-cells in monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Cytometry B Clin Cytom* 2010; **78B**: S19–S23.
- 182 Rawstron AC, Bennett F, Hillmen P. The biological and clinical relationship between CD5+23+ monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007; **139**: 724–729.
- 183 Rawstron AC, Shingles J, de Tute R, Bennett F, Jack AS, Hillmen P. Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) and CLL-type monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) show
- 178

- differential expression of molecules involved in lymphoid tissue homing. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; **78B**: S42–S46.
- 184 Rossi D, Sozzi E, Puma A, De Paoli L, Rasi S, Spina V *et al.* The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br J Haematol* 2009; **146**: 64–75.
- 185 Xochelli A, Kalpadakis C, Gardiner A, Baliakas P, Vassilakopoulos TP, Mould S *et al.* Clonal B-cell lymphocytosis exhibiting immunophenotypic features consistent with a marginal-zone origin: is this a distinct entity? *Blood* 2014; **123**: 1199–1206.
- 186 Brusca A, Monti S, Arcaini L, Ramponi A, Rattotti S, Lucioni M *et al.* Molecular lesions of signalling pathway genes in clonal B-cell lymphocytosis with marginal zone features. *Br. J. Haematol.* 2014; **167**: 718–720.
- 187 Amato D, Oscier DG, Davis Z, Mould S, Zheng J, Kolomietz E *et al.* Cytogenetic aberrations and immunoglobulin VH gene mutations in clinically benign CD5- monoclonal B-cell lymphocytosis. *Am J Clin Pathol* 2007; **128**: 333–338.
- 188 Nieto WG, Teodosio C, López A, Rodríguez-Caballero A, Romero A, Baccena P *et al.* Non-CLL-like monoclonal B-Cell lymphocytosis in the general population: Prevalence and phenotypic/genetic characteristics. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2010; **78**: S24–S34.
- 189 Fazi C, Scarfò L, Pecciarini L, Cottini F, Dagklis A, Janus A *et al.* General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood* 2011; **118**: 6618–6625.
- 190 Marti GE, Muller J, Stetler-Stevenson M, Caporaso NE. B-cell monoclonal lymphocytosis in three individuals living near a hazardous waste site. 1997.
- 191 Sarasua SM, Vogt RF, Middleton DC, Slade BA, Mcgeehin MA, Lybarger JA. 'CLL-like' B-cell phenotypes detected in superfund studies: epidemiologic methods and findings. 1997.
- 192 Shim YK, Middleton DC, Caporaso NE, Rachel JM, Landgren O, Abbasi F *et al.* Prevalence of monoclonal B-cell lymphocytosis: a systematic review. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; **78B**: S10–S18.
- 193 Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, Cullen M, Kennedy B, Richards SJ *et al.* Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* 2002; **100**: 2289–2290.
- 194 Marti GE, Carter P, Abbasi F, Washington GC, Jain N, Zenger VE *et al.* B-cell monoclonal lymphocytosis and B-cell abnormalities in the setting of familial B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2003; **52**: 1–12.
- 195 Ghia P, Prato G, Scielzo C, Stella S, Geuna M, Guida G *et al.* Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood* 2004; **103**: 2337–2342.
- 196 Rachel JM, Zucker ML, Fox CM, Plapp F V, Menitove JE, Abbasi F *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis in blood donors. *Br J Haematol* 2007; **139**: 832–836.
- 197 Dagklis A, Fazi C, Sala C, Cantarelli V, Scielzo C, Massacane R *et al.* The immunoglobulin gene repertoire of low-count chronic lymphocytic leukemia (CLL)-like monoclonal B lymphocytosis is different from CLL: diagnostic implications for clinical monitoring. *Blood* 2009; **114**: 26–32.
- 198 Matos DM, Ismael SJ, Scrideli CA, de Oliveira FM, Rego EM, Falcao RP. Monoclonal B-cell lymphocytosis in first-degree relatives of patients with sporadic (non-familial) chronic

- lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; **147**: 339–346.
- 199 Goldin LR, Lanasa MC, Slager SL, Cerhan JR, Vachon CM, Strom SS *et al.* Common occurrence of monoclonal B-cell lymphocytosis among members of high-risk CLL families. *Br J Haematol* 2010; **151**: 152–158.
- 200 Shim YK, Rachel JM, 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**: 1319–1326.
- 201 Aljurf M, Rawas F, Alnounou R, Bakshi N, Chaudhri N, Khalil S *et al.* Prevalence and relative proportions of CLL and non-CLL monoclonal B-cell lymphocytosis phenotypes in the Middle Eastern population. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2017; **10**: 42–43.
- 202 Demirci T, Yegin ZA, Kursunoglu N, Yilmaz Z, Suyani E, Ozkurt ZN *et al.* Prevalence of monoclonal B lymphocytosis in first-degree relatives of chronic lymphocytic leukemia patients in Turkey. *Turkish J Haematol Off J Turkish Soc Haematol* 2015; **32**: 29–34.
- 203 Bajuk P, Furlan T, Cernelc P, Ceh M, Podgornik H. Monoclonal B-cell lymphocytosis in the population of Slovenian region of Lower Carniola. *Int J Lab Hematol* 2016; **38**: 341–346.
- 204 Rawstron AC, Ssemaganda A, de Tute R, Doughty C, Newton D, Vardi A *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis in a hospital-based UK population and a rural Ugandan population: a cross-sectional study. *Lancet Haematol* 2017; **4**: e334–e340.
- 205 Almeida J, Nieto WG, Teodosio C, Pedreira CE, Lopez A, Fernandez-Navarro P *et al.* CLL-like B-lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults. *Leukemia*. 2011; **25**: 718–722.
- 206 Boggs DR, Chen SC, Zhang ZN, Zhang A. Chronic lymphocytic leukemia in China. *Am J Hematol* 1987; **25**: 349–354.
- 207 Kwong YL, Wong KF, Chan LC, Liang RH, Chan JK, Wei D *et al.* The spectrum of chronic lymphoproliferative disorders in Chinese people. An analysis of 64 cases. *Cancer* 1994; **74**: 174–181.
- 208 Gale RP, Cozen W, Goodman MT, Wang FF, Bernstein L. Decreased chronic lymphocytic leukemia incidence in Asians in Los Angeles County. *Leuk Res* 2000; **24**: 665–669.
- 209 Pan JWY, Cook LS, Schwartz SM, Weis NS. Incidence of leukemia in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer Causes Control* 2002; **13**: 791–795.
- 210 Ruchlemer R, Polliack A. Geography, ethnicity and 'roots' in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013; **54**: 1142–1150.
- 211 Kawamata N, Moreilhon C, Saitoh T, Karasawa M, Bernstein BK, Sato-Otsubo A *et al.* Genetic differences between Asian and Caucasian chronic lymphocytic leukemia. *Int J Oncol* 2013; **43**: 561–565.
- 212 Yang S-M, Li J-Y, Gale RP, Huang X-J. The mystery of chronic lymphocytic leukemia (CLL): Why is it absent in Asians and what does this tell us about etiology, pathogenesis and biology? *Blood Rev* 2015; **29**: 205–213.
- 213 Ferreira de Faria M, Almeida J, Kimura E, Koulteris E, Andrade Silva C, Borges F *et al.* Frequency of CLL-like Monoclonal B Lymphocytosis in Japanese People Living in Sao Paulo, Brazil. *EHA Abstr* 2015.
- 214 Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton JAL, Plummer M *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2008; **359**: 575–583.
- 215 Gunz FW, Gunz JP, Veale AM, Chapman CJ, Houston IB. Familial

- leukaemia: a study of 909 families. *Scand J Haematol* 1975; **15**: 117–131.
- 216 Catovsky D. Definition and diagnosis of sporadic and familial chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004; **18**: 783–94.
- 217 Goldin LR, Slager SL, Caporaso NE. Familial chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol* 2010; **17**: 350–355.
- 218 Slager SL, Kay NE. Familial chronic lymphocytic leukemia: what does it mean to me? *Clin Lymphoma Myeloma* 2009; **9**: S194–S197.
- 219 Villegas Gracia R, Franco Alzate C, Rendon Henao J, Torres Hernandez JD, Jaramillo Arbelaez PE. Frequency of monoclonal B-cell lymphocytosis in relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Colomb Med* 2016; **47**: 81–86.
- 220 Scarfo L, Ferreri AJM, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; **104**: 169–182.
- 221 Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 2017; **92**: 946–965.
- 222 Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2017; **3**: 16096.
- 223 Rai K, Sawitsky A, Cronkite E, Chanana A, Levy R, Pasternack B. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; **46**: 219–234.
- 224 Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; **48**: 198–206.
- 225 Abbott BL. Recent advances in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Invest* 2006; **24**: 302–309.
- 226 Abbott BL. Chronic lymphocytic leukemia: recent advances in diagnosis and treatment. *Oncologist* 2006; **11**: 21–30.
- 227 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H *et al.* Guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment and supportive management of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2018; : en prensa desde 14 marzo 2018; 10.1182/blood-2017-0.
- 228 Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 2011; **117**: 1781–91.
- 229 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-cappio F, Dighiero G, Do H. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute – Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; **111**: 5446–5456.
- 230 Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 399–408.
- 231 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; **68**: 7–30.
- 232 Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)—Then and now. *Am J Hematol* 2016; **91**: 330–340.
- 233 Watson L, Wyld P, Catovsky D. Disease burden of chronic lymphocytic leukaemia within the European Union. *Eur J Haematol* 2008; **81**: 253–258.
- 234 Molica S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2006; **47**: 1477–1480.
- 235 Burger JA. Inhibiting B-cell receptor signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol*

- Malig Rep* 2012; **7**: 26–33.
- 236 Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 2012; **2012**: 88–96.
- 237 Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA *et al*. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; **369**: 32–42.
- 238 Wiestner A. The role of B-cell receptor inhibitors in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2015; **100**: 1495–1507.
- 239 Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF *et al*. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2016; **374**: 311–322.
- 240 Robak P, Robak T. Novel synthetic drugs currently in clinical development for chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Investig Drugs* 2017; **26**: 1249–1265.
- 241 Seymour JF, Ma S, Brander DM, Choi MY, Barrientos J, Davids MS *et al*. Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. *Lancet Oncol* 2017; **18**: 230–240.
- 242 Ahn IE, Farooqui MZH, Tian X, Valdez J, Sun C, Soto S *et al*. Depth and durability of response to ibrutinib in CLL: 5-year follow-up of a phase II study. *Blood* 2018; : en prensa desde 26 febrero 2018; 10.1182/blood-201.
- 243 O'Brien S, Furman RR, Coutre S, Flinn IW, Burger JA, Blum K *et al*. Single-agent ibrutinib in treatment-naïve and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a 5-year experience. *Blood* 2018; **131**: 1910–1919.
- 244 Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F *et al*. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin* 2016; **66**: 115–132.
- 245 Mak V, Ip D, Mang O, Dalal C, Huang S, Gerrie A *et al*. Preservation of lower incidence of chronic lymphocytic leukemia in Chinese residents in British Columbia: a 26-year survey from 1983 to 2008. *Leuk Lymphoma* 2014; **55**: 824–827.
- 246 Clarke CA, Glaser SL, Gomez SL, Wang SS, Keegan TH, Yang J *et al*. Lymphoid malignancies in U.S. Asians: incidence rate differences by birthplace and acculturation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; **20**: 1064–1077.
- 247 Slager SL, Caporaso NE, de Sanjose S, Goldin LR. Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 2013; **50**: 296–302.
- 248 Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Webb E, Sellick G, Wild R *et al*. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2008; **40**: 1204–1210.
- 249 Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Di Bernardo MC, Dobbins SE, Torres M, Mansouri M *et al*. Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat Genet* 2010; **42**: 132–136.
- 250 Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Ma Y, Robertson L, Pittman AM, Price A *et al*. Fine-scale mapping of the 6p25.3 chronic lymphocytic leukaemia susceptibility locus. *Hum Mol Genet* 2010; **19**: 1840–1845.
- 251 Crowther-Swanepoel D, Corre T, Lloyd A, Gaidano G, Olver B, Bennett FL *et al*. Inherited genetic susceptibility to monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood* 2010; **116**: 5957–5960.
- 252 Crowther-Swanepoel D, Mansouri M, Enjuanes A, Vega A, Smedby KE, Ruiz-Ponte C *et al*. Verification that common variation at 2q37.1, 6p25.3, 11q24.1, 15q23, and 19q13.32 influences chronic lymphocytic leukaemia risk. *Br J Haematol* 2010;

- 150**: 473–479.
- 253 Crowther-Swanepoel D, Di Bernardo MC, Jamroziak K, Karabon L, Frydecka I, Deaglio S *et al*. Common genetic variation at 15q25.2 impacts on chronic lymphocytic leukaemia risk. *Br J Haematol* 2011; **154**: 229–233.
- 254 Slager SL, Rabe KG, Achenbach SJ, Vachon CM, Goldin LR, Strom SS *et al*. Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood* 2011; **117**: 1911–1916.
- 255 Berndt SI, Skibola CF, Joseph V, Camp NJ, Nieters A, Wang Z *et al*. Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2013; **45**: 868–876.
- 256 Speedy HE, Sava G, Houlston RS. Inherited susceptibility to CLL. *Adv Exp Med Biol* 2013; **792**: 293–308.
- 257 Speedy HE, Di Bernardo MC, Sava GP, Dyer MJS, Holroyd A, Wang Y *et al*. A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2014; **46**: 56–60.
- 258 Kandaswamy R, Sava GP, Speedy HE, Bea S, Martin-Subero JI, Studd JB *et al*. Genetic Predisposition to Chronic Lymphocytic Leukemia Is Mediated by a BMF Super-Enhancer Polymorphism. *Cell Rep* 2016; **16**: 2061–2067.
- 259 Lan Q, Au W-Y, Chanock S, Tse J, Wong K, Shen M *et al*. Genetic susceptibility for chronic lymphocytic leukemia among Chinese in Hong Kong. *Eur J Haematol* 2010; **85**: 492–495.
- 260 Rodrigues CA, Goncalves MV, Ikoma MRV, Lorand-Metze I, Pereira AD, Farias DLC de *et al*. Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2016; **38**: 346–357.
- 261 Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; **333**: 1052–1057.
- 262 Abrisqueta P, Pereira A, Rozman C, Aymersch M, Gine E, Moreno C *et al*. Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980–2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood*. 2009; **114**: 2044–2050.
- 263 Dearden C. Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 2008; **2008**: 450–456.
- 264 Molica S, Mirabelli R, Molica M, Levato L, Mauro FR, Foa R. Clinical relevance and treatment of nonautoimmune anemia in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Manag Res* 2011; **3**: 211–217.
- 265 Cramer P, Langerbeins P, Eichhorst B, Hallek M. Advances in first-line treatment of chronic lymphocytic leukemia: current recommendations on management and first-line treatment by the German CLL Study Group (GCLLSG). *Eur J Haematol* 2016; **96**: 9–18.
- 266 Murakami J, Shimizu Y. Hepatic manifestations in hematological disorders. *Int J Hepatol* 2013; **2013**: 484903.
- 267 Duek A, Shvidel L, Braester A, Berrebi A. Clinical and immunologic aspects of B chronic lymphocytic leukemia associated with autoimmune disorders. *Isr Med Assoc J* 2006; **8**: 828–831.
- 268 Zent CS, Kay NE. Autoimmune complications in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; **23**: 47–59.
- 269 Hodgson K, Ferrer G, Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity: a systematic review. *Haematologica* 2011; **96**: 752–761.
- 270 Shvidel L, Tadmor T, Braester A, Bairey O, Rahimi-Levene N, Herishanu Y *et al*. Pathogenesis, prevalence, and prognostic

- significance of cytopenias in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a retrospective comparative study of 213 patients from a national CLL database of 1,518 cases. *Ann Hematol* 2013; **92**: 661–667.
- 271 Rogers KA, Woyach JA. Secondary autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2016; **43**: 300–310.
- 272 Tsang M, Parikh SA. A Concise Review of Autoimmune Cytopenias in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2017; **12**: 29–38.
- 273 Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; **23**: 145–153.
- 274 Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood* 2015; **126**: 573–81.
- 275 Ahmed S, Siddiqui AK, Rossoff L, Sison CP, Rai KR. Pulmonary Complications in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer* 2003; **98**: 1912–1917.
- 276 Hamblin AD, Hamblin TJ. The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *Br Med Bull* 2008; **87**: 49–62.
- 277 Landgren O, Rapkin JS, Caporaso NE, Mellekjær L, Gridley G, Goldin LR *et al.* Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; **109**: 2198–2201.
- 278 Nosari A. Infectious complications in chronic lymphocytic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012; **4**: e2012070.
- 279 Wadhwa PD, Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; **33**: 240–249.
- 280 Lanasa MC, Weinberg JB. Immunologic aspects of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Immunol Res* 2011; **49**: 269–280.
- 281 Molica S. Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival, and treatment. *Leuk Lymphoma* 1994; **13**: 203–214.
- 282 Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E *et al.* Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* 2005; **106**: 2018–2025.
- 283 Giannopoulos K, Schmitt M, Kowal M, Wlasiuk P, Bojarska-Junak A, Chen J *et al.* Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Rep* 2008; **20**: 677–682.
- 284 Pourgheysari B, Bruton R, Parry H, Billingham L, Fegan C, Murray J *et al.* The number of cytomegalovirus-specific CD4+ T cells is markedly expanded in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and determines the total CD4+ T-cell repertoire. *Blood* 2010; **116**: 2968–2974.
- 285 D’Arena G, Laurenti L, Minervini MM, Deaglio S, Bonello L, De Martino L *et al.* Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk Res* 2011; **35**: 363–368.
- 286 Jadidi-Niaragh F, Yousefi M, Memarian A, Hojjat-Farsangi M, Khoshnoodi J, Razavi SM *et al.* Increased frequency of CD8+ and CD4+ regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression. *Cancer Invest* 2013; **31**: 121–131.
- 287 Yousefi M, Movassaghpour AA, Shamsasenjan K, Ghalamfarsa G, Sadreddini S, Jadidi-Niaragh F *et al.* The skewed balance between Tregs and Th17 in chronic lymphocytic leukemia. *Future Oncol* 2015; **11**: 1567–1582.
- 288 Pizzolo G, Chilosi M, Ambrosetti A,

- Semenzato G, Fiore-Donati L, Perona G. Immunohistologic study of bone marrow involvement in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1983; **62**: 1289–1296.
- 289 Serrano D, Monteiro J, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Lichtman SM *et al.* Clonal expansion within the CD4+CD57+ and CD8+CD57+ T cell subsets in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol* 1997; **158**: 1482–1489.
- 290 Goolsby CL, Kuchnio M, Finn WG, Peterson L. Expansions of clonal and oligoclonal T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia are primarily restricted to the CD3(+)CD8(+) T-cell population. *Cytometry* 2000; **42**: 188–195.
- 291 te Raa GD, Tonino SH, Remmerswaal EBM, van Houte AJ, Koene HR, van Oers MH *et al.* Chronic lymphocytic leukemia specific T-cell subset alterations are clone-size dependent and not present in monoclonal B lymphocytosis. *Leuk Lymphoma* 2012; **53**: 2321–2325.
- 292 Chiorazzi N, Fu SM, Montazeri G, Kunkel HG, Rai K, Gee T. T cell helper defect in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol* 1979; **122**: 1087–1090.
- 293 Lauria F, Foa R, Mantovani V, Fierro MT, Catovsky D, Tura S. T-cell functional abnormality in B-chronic lymphocytic leukaemia: evidence of a defect of the T-helper subset. *Br J Haematol* 1983; **54**: 277–283.
- 294 Foa R, Lauria F. Reduced T lymphocyte colonies in B chronic lymphocytic leukaemia. III. Evidence of a proliferative abnormality of the T helper cell population. *Clin Exp Immunol* 1982; **50**: 336–340.
- 295 Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgun G, Le Dieu R, Blum W *et al.* Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest* 2008; **118**: 2427–2437.
- 296 Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, Gribben JG. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood* 2012; **120**: 1412–1421.
- 297 Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S *et al.* T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 2013; **121**: 1612–1621.
- 298 Riches JC, Gribben JG. Immunomodulation and immune reconstitution in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 2014; **51**: 228–234.
- 299 Scrivener S, Goddard R V, Kaminski ER, Prentice AG. Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 2003; **44**: 383–389.
- 300 Christopoulos P, Pfeifer D, Bartholome K, Follo M, Timmer J, Fisch P *et al.* Definition and characterization of the systemic T-cell dysregulation in untreated indolent B-cell lymphoma and very early CLL. *Blood* 2011; **117**: 3836–3846.
- 301 Levine PH, Ablashi D V, Berard CW, Carbone PP, Waggoner DE, Malan L. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Cancer* 1971; **27**: 416–421.
- 302 Mueller N, Evans A, Harris NL, Comstock GW, Jellum E, Magnus K *et al.* Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* 1989; **320**: 689–695.
- 303 Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1989; **320**: 502–506.
- 304 Wu TC, Mann RB, Charache P,

- Hayward SD, Staal S, Lambe BC *et al.* Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1990; **46**: 801–804.
- 305 Anagnostopoulos I, Herbst H, Niedobitek G, Stein H. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* 1989; **74**: 810–816.
- 306 Mahieux R, Gessain A. Adult T-cell leukemia/lymphoma and HTLV-1. *Curr Hematol Malig Rep* 2007; **2**: 257–264.
- 307 Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; **77**: 7415–7419.
- 308 Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Gonzalez-Garcia E, Payer AR *et al.* Expansion of NK cells and reduction of NKG2D expression in chronic lymphocytic leukemia. Correlation with progressive disease. *PLoS One* 2014; **9**: e108326.
- 309 Fust G, Miszlay Z, Czink E, Varga L, Paloczi K, Szegedi G *et al.* C1 and C4 abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia and their significance. *Immunol Lett* 1987; **14**: 255–259.
- 310 Orfao A, Gonzalez M, San Miguel JF, Rios A, Canizo MC, Hernandez J *et al.* B-cell chronic lymphocytic leukaemia: prognostic value of the immunophenotype and the clinico-haematological features. *Am J Hematol* 1989; **31**: 26–31.
- 311 Itala M, Helenius H, Nikoskelainen J, Remes K. Infections and serum IgG levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1992; **48**: 266–270.
- 312 Best OG, Crassini K, Freeman JA, Mulligan SP. The clinical significance of hypogammaglobulinaemia and serum immunoglobulin G subclass deficiency in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Scand. J. Infect. Dis.* 2013; **45**: 729.
- 313 Parikh SA, Leis JF, Chaffee KG, Call TG, Hanson CA, Ding W *et al.* Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia: Natural history, clinical correlates, and outcomes. *Cancer* 2015; **121**: 2883–2891.
- 314 Andersen MA, Vojdeman FJ, Andersen MK, Brown P de N, Geisler CH, Weis Bjerrum O *et al.* Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia is a predictor of early death. *Leuk Lymphoma* 2016; **57**: 1592–1599.
- 315 Mauro FR, Morabito F, Vincelli ID, Petrucci L, Campanelli M, Salaroli A *et al.* Clinical relevance of hypogammaglobulinemia, clinical and biologic variables on the infection risk and outcome of patients with stage A chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2017; **57**: 65–71.
- 316 Pallasch CP, Ulbrich S, Brinker R, Hallek M, Uger RA, Wendtner C-M. Disruption of T cell suppression in chronic lymphocytic leukemia by CD200 blockade. *Leuk Res* 2009; **33**: 460–464.
- 317 Piper KP, Karanth M, McLarnon A, Kalk E, Khan N, Murray J *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia cells drive the global CD4+ T cell repertoire towards a regulatory phenotype and leads to the accumulation of CD4+ forkhead box P3+ T cells. *Clin Exp Immunol* 2011; **166**: 154–163.
- 318 Pascutti MF, Jak M, Tromp JM, Derks IAM, Remmerswaal EBM, Thijssen R *et al.* IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells. *Blood* 2013; **122**: 3010–3019.
- 319 Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and

- other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* 2014; **24**: 71–81.
- 320 Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1863**: 401–413.
- 321 van Attekum MH, Eldering E, Kater AP. Chronic lymphocytic leukemia cells are active participants in microenvironmental cross-talk. *Haematologica* 2017; **102**: 1469–1476.
- 322 Cheson BD. Infectious and immunosuppressive complications of purine analog therapy. *J Clin Oncol* 1995; **13**: 2431–2448.
- 323 Anaissie EJ, Kontoyiannis DP, O'Brien S, Kantarjian H, Robertson L, Lerner S *et al*. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Ann Intern Med* 1998; **129**: 559–566.
- 324 Morrison VA, Rai KR, Peterson BL, Kolitz JE, Elias L, Appelbaum FR *et al*. Impact of therapy With chlorambucil, fludarabine, or fludarabine plus chlorambucil on infections in patients with chronic lymphocytic leukemia: Intergroup Study Cancer and Leukemia Group B 9011. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 3611–3621.
- 325 Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L *et al*. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1750–1757.
- 326 Leporrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B *et al*. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 2001; **98**: 2319–2325.
- 327 Steurer M, Pall G, Richards S, Schwarzer G, Bohlius J, Greil R. Single-agent purine analogues for the treatment of chronic lymphocytic leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2006; **32**: 377–389.
- 328 van der Velden AMT, Mulder AHL, Hartkamp A, Diepersloot RJA, van Velzen-Blad H, Biesma DH. Influenza virus vaccination and booster in B-cell chronic lymphocytic leukaemia patients. *Eur J Intern Med* 2001; **12**: 420–424.
- 329 Hartkamp A, Mulder AH, Rijkers GT, van Velzen-Blad H, Biesma DH. Antibody responses to pneumococcal and haemophilus vaccinations in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Vaccine* 2001; **19**: 1671–1677.
- 330 Sinisalo M, Vilpo J, Itala M, Vakevainen M, Taurio J, Aittoniemi J. Antibody response to 7-valent conjugated pneumococcal vaccine in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Vaccine* 2007; **26**: 82–87.
- 331 Gale RP, Chapel HM, Bunch C, Rai KR, Foon K, Courter SG *et al*. Intravenous immunoglobulin for the prevention of infection in chronic lymphocytic leukemia. A randomized, controlled clinical trial. *N Engl J Med* 1988; **319**: 902–907.
- 332 Griffiths H, Brennan V, Lea J, Bunch C, Lee M, Chapel H. Crossover study of immunoglobulin replacement therapy in patients with low-grade B-cell tumors. *Blood* 1989; **73**: 366–368.
- 333 Jurlander J, Geisler CH, Hansen MM. Treatment of hypogammaglobulinaemia in chronic lymphocytic leukaemia by low-dose intravenous gammaglobulin. *Eur J Haematol* 1994; **53**: 114–118.
- 334 Boughton BJ, Jackson N, Lim S, Smith N. Randomized trial of intravenous immunoglobulin prophylaxis for patients with chronic lymphocytic leukaemia and secondary hypogammaglobulinaemia. *Clin Lab Haematol* 1995; **17**: 75–80.

- 335 Weeks JC, Tierney MR, Weinstein MC. Cost effectiveness of prophylactic intravenous immune globulin in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1991; **325**: 81–86.
- 336 Compagno N, Malipiero G, Cinetto F, Agostini C. Immunoglobulin replacement therapy in secondary hypogammaglobulinemia. *Front Immunol* 2014; **5**: 626.
- 337 Manusow D, Weinerman BH. Subsequent neoplasia in chronic lymphocytic leukemia. *JAMA* 1975; **232**: 267–269.
- 338 Hisada M, Biggar RJ, Greene MH, Fraumeni JFJ, Travis LB. Solid tumors after chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **98**: 1979–1981.
- 339 Tsimberidou A-M, Wen S, McLaughlin P, O'Brien S, Wierda WG, Lerner S *et al.* Other malignancies in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 904–910.
- 340 Morton LM, Curtis RE, Linet MS, Bluhm EC, Tucker MA, Caporaso N *et al.* Second malignancy risks after non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: differences by lymphoma subtype. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 4935–4944.
- 341 Peterson LC, Bloomfield CD, Sundberg RD, Gajl-Peczalska KJ, Brunning RD. Morphology of chronic lymphocytic leukemia and its relationship to survival. *Am J Med* 1975; **59**: 316–324.
- 342 Dubner HN, Crowley JJ, Schilling RF. Prognostic value of nucleoli and cell size in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 1978; **4**: 337–341.
- 343 Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000; **4**: 22–47.
- 344 Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998; **51**: 364–369.
- 345 Dillman RO. Immunophenotyping of chronic lymphoid leukemias. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 1193–1194.
- 346 Alapat D, Coviello-Malle J, Owens R, Qu P, Barlogie B, Shaughnessy JD *et al.* Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol* 2012; **137**: 93–100.
- 347 Palumbo GA, Parrinello N, Fargione G, Cardillo K, Chiarenza A, Berretta S *et al.* CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2009; **33**: 1212–1216.
- 348 Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CRMC, Maekawa Y, Tamashiro N, Takao TT *et al.* CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2014; **86**: 98–105.
- 349 Falay M, Afacan Öztürk B, Güneş K, Kalpakçı Y, Dağdaş S, Ceran F *et al.* The Role of CD200 and CD43 expression in differential diagnosis between Chronic Lymphocytic Leukemia and Mantle Cell Lymphoma. *Turkish J Haematol Off J Turkish Soc Haematol* 2017; : en prensa desde 17 julio 2017; 10.4274/tjh.2017.00.
- 350 Falay M, Ozet G. Immunophenotyping of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Lab* 2017; **63**: 1621–1626.
- 351 Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH *et al.* The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; **8**: 1640–1645.
- 352 Criel A, Michaux L, De Wolf-Peeters C. The concept of typical and atypical chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 1999; **33**: 33–45.

- 353 Damle RN, Wasil T, 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**: 1840–1847.
- 354 Hulkkonen J, Vilpo L, Hurme M, Vilpo J. Surface antigen expression in chronic lymphocytic leukemia: clustering analysis, interrelationships and effects of chromosomal abnormalities. *Leukemia* 2002; **16**: 178–185.
- 355 Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M *et al.* ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1764–1775.
- 356 Schroers R, Griesinger F, Trumper L, Haase D, Kulle B, Klein-Hitpass L *et al.* Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; **19**: 750–758.
- 357 Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 2008; **22**: 211–219.
- 358 Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F *et al.* Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **111**: 865–873.
- 359 Butrym A, Majewski M, Dzietczenia J, Kuliczkowski K, Mazur G. High CD74 expression correlates with ZAP70 expression in B cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Med Oncol* 2013; **30**: 560.
- 360 Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nuckel H *et al.* CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2014; **32**: 897–904.
- 361 Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1910–1916.
- 362 Aoun P, Blair HE, Smith LM, Dave BJ, Lynch J, Weisenburger DD *et al.* Fluorescence in situ hybridization detection of cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2004; **45**: 1595–1603.
- 363 Sindelarova L, Michalova K, Zemanova Z, Ransdorfova S, Brezinova J, Pekova S *et al.* Incidence of chromosomal anomalies detected with FISH and their clinical correlations in B-chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; **160**: 27–34.
- 364 Quijano S, López A, Rasillo A, Sayagués JM, Barrera S, Sánchez ML *et al.* Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2008; **74**: 139–149.
- 365 Ouilllette P, Collins R, Shakhani S, Li J, Peres E, Kujawski L *et al.* Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; **118**: 3051–3061.
- 366 Davids MS, Vartanov A, Werner L, Neuberg D, Dal Cin P, Brown JR. Controversial fluorescence in situ hybridization cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia: new insights from a large cohort. *Br J Haematol* 2015; **170**: 694–703.
- 367 Van Dyke DL, Werner L, Rassenti LZ, Neuberg D, Ghia E, Heerema NA *et al.* The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol* 2016; **173**: 105–113.
- 368 Lia M, Carette A, Tang H, Shen Q,

- Mo T, Bhagat G *et al.* Functional dissection of the chromosome 13q14 tumor-suppressor locus using transgenic mouse lines. *Blood* 2012; **119**: 2981–2990.
- 369 Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T *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.
- 370 Hernandez-Sanchez M, Rodriguez-Vicente AE, Hernandez J-A, Lumbreras E, Sarasquete M-E, Martin A-A *et al.* MiRNA expression profile of chronic lymphocytic leukemia patients with 13q deletion. *Leuk Res* 2016; **46**: 30–36.
- 371 Palamarchuk A, Efanov A, Nazaryan N, Santanam U, Alder H, Rassenti L *et al.* 13q14 deletions in CLL involve cooperating tumor suppressors. *Blood* 2010; **115**: 3916–3922.
- 372 Pekarsky Y, Croce CM. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death Differ* 2015; **22**: 6–11.
- 373 Balatti V, Pekarky Y, Rizzotto L, Croce CM. miR deregulation in CLL. *Adv Exp Med Biol* 2013; **792**: 309–325.
- 374 Balatti V, Acunzo M, Pekarky Y, Croce CM. Novel mechanisms of regulation of miRNAs in CLL. *Trends in cancer* 2016; **2**: 134–143.
- 375 Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C *et al.* Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; **121**: 287–295.
- 376 Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P, Kraut N *et al.* Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 3937–3949.
- 377 Dickinson JD, Joshi A, Iqbal J, Sanger W, Bierman PJ, Joshi SS. Genomic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia influence gene expression by a gene dosage effect. *Int J Mol Med* 2006; **17**: 769–778.
- 378 Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet* 2010; **11**: 685–696.
- 379 Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K *et al.* Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009; **361**: 1058–1066.
- 380 Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; **475**: 101–105.
- 381 Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K *et al.* SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011; **365**: 2497–2506.
- 382 Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordonez GR, Jares P, Bassaganyas L *et al.* Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; **44**: 47–52.
- 383 Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J *et al.* Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011; **208**: 1389–1401.
- 384 Rasi S, Monti S, Spina V, Foa R, Gaidano G, Rossi D. Analysis of NOTCH1 mutations in monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica* 2012; **97**: 153–154.
- 385 Greco M, Capello D, Bruscaggini A, Spina V, Rasi S, Monti S *et al.* Analysis of SF3B1 mutations in monoclonal B-cell lymphocytosis. *Hematol. Oncol.* 2013; **31**: 54–55.

- 386 Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS *et al.* Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013; **152**: 714–726.
- 387 Landau DA, Wu CJ. Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics. *Genome Med* 2013; **5**: 47.
- 388 Lionetti M, Fabris S, Cutrona G, Agnelli L, Ciardullo C, Matis S *et al.* High-throughput sequencing for the identification of NOTCH1 mutations in early stage chronic lymphocytic leukaemia: biological and clinical implications. *Br J Haematol* 2014; **165**: 629–639.
- 389 Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J *et al.* Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015; **526**: 525–530.
- 390 Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI *et al.* Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2015; **526**: 519–524.
- 391 Barrio S, Shanafelt TD, Ojha J, Chaffee KG, Secreto C, Kortüm KM *et al.* Genomic characterization of high-count MBL cases indicates that early detection of driver mutations and subclonal expansion are predictors of adverse clinical outcome. *Leukemia* 2017; **31**: 170–176.
- 392 Agathangelidis A, Ljungström V, Scarfò L, Fazi C, Gounari M, Pandzic T *et al.* Highly similar genomic landscapes in monoclonal B-cell lymphocytosis and ultra-stable chronic lymphocytic leukemia with low frequency of driver mutations. *Haematologica* 2018; **103**: 865–873.
- 393 Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K *et al.* Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 2009; **113**: 856–865.
- 394 Ramsden DA, Weed BD, Reddy YVR. V(D)J recombination: Born to be wild. *Semin Cancer Biol* 2010; **20**: 254–260.
- 395 Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 251–263.
- 396 Rodgers KK. Riches in RAGs: Revealing the V(D)J Recombinase through High-Resolution Structures. *Trends Biochem Sci* 2017; **42**: 72–84.
- 397 Methot SP, Di Noia JM. Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Adv Immunol* 2017; **133**: 37–87.
- 398 Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1515–1525.
- 399 Ferrarini M. The continuing search for the cell of origin of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Meet Reports* 2009; **3**: 81–85.
- 400 Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, Murray F, Laurell A, Willander 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**: 2879–2885.
- 401 Tobin G. The immunoglobulin genes and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Ups J Med Sci* 2005; **110**: 97–113.
- 402 Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J *et al.* Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2004; **200**: 519–525.
- 403 Widhopf GF 2nd, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients

- express virtually identical immunoglobulins. *Blood* 2004; **104**: 2499–2504.
- 404 Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M *et al.* Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2004; **113**: 1008–1016.
- 405 Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T *et al.* Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007; **109**: 259–270.
- 406 Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra M, Scielzo C *et al.* Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 2008; **111**: 1524–1533.
- 407 Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Forconi F, Maffei R, Laurenti L *et al.* Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. *Br J Haematol* 2009; **144**: 492–506.
- 408 Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F, Hatzl K, Josefsson P, Laoutaris N *et al.* A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia* 2010; **24**: 125–132.
- 409 Darzentas N, Stamatopoulos K. Stereotyped B cell receptors in B cell leukemias and lymphomas. *Methods Mol Biol* 2013; **971**: 135–148.
- 410 Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2017; **31**: 282–291.
- 411 Kostareli E, Hadzidimitriou A, Stavroyianni N, Darzentas N, Athanasiadou A, Gounari M *et al.* Molecular evidence for EBV and CMV persistence in a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Leukemia* 2009; **23**: 919–924.
- 412 Rosen A, Murray F, Evaldsson C, Rosenquist R. Antigens in chronic lymphocytic leukemia--implications for cell origin and leukemogenesis. *Semin Cancer Biol* 2010; **20**: 400–409.
- 413 Sutton L-A, Agathangelidis A, Belessi C, Darzentas N, Davi F, Ghia P *et al.* Antigen selection in B-cell lymphomas--tracing the evidence. *Semin Cancer Biol* 2013; **23**: 399–409.
- 414 Broker BM, Klajman A, Youinou P, Jouquan J, Worman CP, Murphy J *et al.* Chronic lymphocytic leukemic (CLL) cells secrete multispecific autoantibodies. *J Autoimmun* 1988; **1**: 469–481.
- 415 Sthoeger ZM, Wakai M, Tse DB, Vinciguerra VP, Allen SL, Budman DR *et al.* Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1989; **169**: 255–268.
- 416 Lanemo Myhrinder A, Hellqvist E, Sidorova E, Soderberg A, Baxendale H, Dahle C *et al.* A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood* 2008; **111**: 3838–3848.
- 417 Buhler A, Zenz T, Stilgenbauer S. Immunoglobulin heavy chain variable gene usage and (super)-antigen drive in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 373–375.
- 418 Steininger C, Widhopf GF 2nd, Ghia EM, Morello CS, Vanura K, Sanders R *et al.* Recombinant antibodies encoded by IGHV1-69 react with pUL32, a phosphoprotein of cytomegalovirus and B-cell superantigen. *Blood* 2012; **119**:

- 2293–2301.
- 419 Chu CC, CATERA R, HATZI K, Yan X-J, Zhang L, Wang XB *et al.* Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood* 2008; **112**: 5122–5129.
- 420 Hoogeboom R, van Kessel KPM, Hochstenbach F, Wormhoudt TA, Reinten RJA, Wagner K *et al.* A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recognizes and responds to fungi. *J Exp Med* 2013; **210**: 59–70.
- 421 Hacken E ten, Gounari M, Back JW, Shimanovskaya E, Scarfò L, Kim E *et al.* Calreticulin as a novel B-cell receptor antigen in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2017; **102**: e394–e396.
- 422 Steininger C, Rassenti LZ, Vanura K, Eigenberger K, Jager U, Kipps TJ *et al.* Relative seroprevalence of human herpes viruses in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Clin Invest* 2009; **39**: 497–506.
- 423 Vanura K, Rieder F, Kastner M-T, Biebl J, Sandhofer M, Le T *et al.* Chronic lymphocytic leukemia patients have a preserved cytomegalovirus-specific antibody response despite progressive hypogammaglobulinemia. *PLoS One* 2013; **8**: e78925.
- 424 Mockridge CI, Rahman A, Buchan S, Hamblin T, Isenberg DA, Stevenson FK *et al.* Common patterns of B cell perturbation and expanded V4-34 immunoglobulin gene usage in autoimmunity and infection. *Autoimmunity* 2004; **37**: 9–15.
- 425 Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004; **103**: 4389–4395.
- 426 Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Boussiotis V *et al.* Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* 2008; **112**: 188–195.
- 427 Hewamana S, Alghazal S, Lin TT, Clement M, Jenkins C, Guzman ML *et al.* The NF-kappaB subunit Rel A is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukemia and represents a promising therapeutic target. *Blood* 2008; **111**: 4681–4689.
- 428 Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Carsetti L, Bero V, Sica S *et al.* Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2009; **23**: 686–697.
- 429 Packham G, Stevenson F. The role of the B-cell receptor in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Cancer Biol* 2010; **20**: 391–399.
- 430 Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**: 841–894.
- 431 Scupoli MT, Pizzolo G. Signaling pathways activated by the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Hematol* 2012; **5**: 341–348.
- 432 Stadanlick JE, Kaileh M, Karnell FG, Scholz JL, Miller JP, Quinn WJ 3rd *et al.* Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF-kappaB substrate for prosurvival BLYS signaling. *Nat Immunol* 2008; **9**: 1379–1387.
- 433 Gandhirajan RK, Poll-Wolbeck SJ, Gehrke I, Kreuzer K-A. Wnt/beta-catenin/LEF-1 signaling in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a target for current and potential therapeutic options. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; **10**: 716–727.
- 434 Gutierrez AJ, Tschumper RC, Wu X, Shanafelt TD, Eckel-Passow J, Huddleston PM 3rd *et al.* LEF-1 is a prosurvival factor in chronic lymphocytic leukemia and is

- expressed in the preleukemic state of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood* 2010; **116**: 2975–2983.
- 435 Burger JA. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 2011; **2011**: 96–103.
- 436 Choi MY, Kashyap MK, Kumar D. The chronic lymphocytic leukemia microenvironment: Beyond the B-cell receptor. *Best Pract Res Clin Haematol* 2016; **29**: 40–53.
- 437 de Faria JR, de Oliveira JS, Delbone de Faria RM, Silva MR, Goihman S, Yamamoto M *et al.* Prognosis related to staging systems for chronic lymphocytic leukemia. *Sao Paulo Med J* 2000; **118**: 83–88.
- 438 Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood* 2010; **115**: 187–197.
- 439 Chen C, Puvvada S. Prognostic Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2016; **11**: 37–42.
- 440 Durig J, Nuckel H, Cremer M, Fuhrer A, Halfmeyer K, Fandrey J *et al.* ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003; **17**: 2426–2434.
- 441 Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE *et al.* ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; **101**: 4944–4951.
- 442 Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW *et al.* ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004; **363**: 105–111.
- 443 Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, Matutes E, Morilla R, Burford A *et al.* Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2005; **104**: 2124–2132.
- 444 el-Sharnouby JA, el-Shakankiri AA, Hendy OM, Ahmed LMS, Taha AM. Significance of zeta-associated protein (ZAP-70) and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Egypt J Immunol* 2006; **13**: 69–84.
- 445 Gomes LC, Evangelista FCG, Sousa LP de, Araujo SS da S, Carvalho M das G, Sabino A de P. Prognosis biomarkers evaluation in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2017; **10**: 57–62.
- 446 Perbellini O, Falisi E, Giaretta I, Boscaro E, Novella E, Facco M *et al.* Clinical significance of LAIR1 (CD305) as assessed by flow cytometry in a prospective series of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2014; **99**: 881–887.
- 447 Reinisch W, Willheim M, Hilgarth M, Gasche C, Mader R, Szepefalusi S *et al.* Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 2146–2152.
- 448 Gentile M, Cutrona G, Neri A, Molica S, Ferrarini M, Morabito F. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica*. 2009; **94**: 887–888.
- 449 Delgado J, Pratt G, Phillips N, Briones J, Fegan C, Nomdedeu J *et al.* Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *Br J Haematol* 2009; **145**: 801–805.
- 450 Saka B, Aktan M, Sami U, Oner D, Sanem O, Dincol G. Prognostic importance of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lab Haematol* 2006; **28**: 30–35.
- 451 Meuleman N, Stamatopoulos B, Dejeneffe M, El Housni H, Lagneaux L, Bron D. Doubling time of soluble CD23: a powerful prognostic factor

- for newly diagnosed and untreated stage A chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia* 2008; **22**: 1882–1890.
- 452 Shanafelt TD, Hanson C, 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.
- 453 Malek SN. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 2013; **32**: 2805–2817.
- 454 Ouillette P, Collins R, Shakhan S, Li J, Li C, Shedden K *et al.* The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 6778–6790.
- 455 Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, Deambrogi C, Bertoni F, Del Giudice I *et al.* 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; **50**: 633–643.
- 456 Puiggros A, Venturas M, Salido M, Blanco G, Fernandez-Rodriguez C, Collado R *et al.* Interstitial 13q14 deletions detected in the karyotype and translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia: different genetic mechanisms but equivalent poorer clinical outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 2014; **53**: 788–797.
- 457 Mosca L, Fabris S, Lionetti M, Todoerti K, Agnelli L, Morabito F *et al.* Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 5641–5653.
- 458 Puiggros A, Delgado J, Rodriguez-Vicente A, Collado R, Aventin A, Luno E *et al.* Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *Br J Haematol* 2013; **163**: 47–54.
- 459 Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A, Russo Rossi A, De Angeli C, Tiseo R *et al.* Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol* 2008; **142**: 529–537.
- 460 Lehmann S, Ogawa S, Raynaud SD, Sanada M, Nannya Y, Tichioni M *et al.* Molecular allelokaryotyping of early-stage, untreated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2008; **112**: 1296–1305.
- 461 Brown JR, Hanna M, Tesar B, Werner L, Pochet N, Asara JM *et al.* Integrative genomic analysis implicates gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 3791–3802.
- 462 Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, Wildenberger K, Bentz M, Dohner K *et al.* Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1999; **13**: 1331–1334.
- 463 Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007; **21**: 2442–2451.
- 464 Kiefer Y, Schulte C, Tiemann M, Bullerdiel J. Chronic lymphocytic leukemia-associated chromosomal abnormalities and miRNA deregulation. *Appl. Clin. Genet.* 2012; **5**: 21–28.
- 465 Dalsass A, Mestichelli F, Ruggieri M, Gaspari P, Pezzoni V, Vagnoni D *et al.* 6q deletion detected by fluorescence in situ hybridization using bacterial artificial chromosome

- in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2013; **91**: 10–19.
- 466 Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Habe S, Winkler D *et al*. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 4473–4479.
- 467 Gonzalez D, Martinez P, 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**: 2223–2229.
- 468 Dicker F, Herholz H, 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**: 117–124.
- 469 Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton L-A, Rossi D, Minga E, Villamor N *et al*. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2015; **29**: 329–336.
- 470 Rossi D, Spina V, Bomben R, Rasi S, Dal-Bo M, Bruscaggin A *et al*. Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; **121**: 4902–4905.
- 471 Chigrinova E, Rinaldi A, Kwee I, Rossi D, Rancoita PM V, Strefford JC *et al*. Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood* 2013; **122**: 2673–2682.
- 472 Parikh SA, Shanafelt TD. Risk factors for Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2014; **9**: 294–299.
- 473 Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: pathogenesis and management. *Semin Oncol* 2016; **43**: 311–319.
- 474 Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ *et al*. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 2012; **119**: 329–331.
- 475 Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C *et al*. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; **121**: 1403–1412.
- 476 Lopez C, Delgado J, Costa D, Conde L, Ghita G, Villamor N *et al*. Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; **51**: 881–889.
- 477 Jeromin S, Weissmann S, 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**: 108–117.
- 478 Ouillette P, Saiya-Cork K, 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**: 2893–2904.
- 479 Edelman J, Tausch E, Landau DA, Robrecht S, Bahlo J, Fischer K *et al*. Frequent evolution of copy number alterations in CLL following first-line treatment with FC(R) is enriched with TP53 alterations: results from the CLL8 trial. *Leukemia*. 2017; **31**: 734–738.
- 480 Del Giudice I, Chiaretti S, Santangelo S, Tavolaro S, Peragine N, Marinelli M *et al*. Stereotyped subset #1 chronic lymphocytic leukemia: a direct link between B-cell receptor structure, function, and patients' prognosis. *Am J Hematol* 2014; **89**: 74–82.
- 481 Marincevic M, Mansouri M, Kanduri M, Isaksson A, Goransson H, Smedby KE *et al*. Distinct gene

- expression profiles in subsets of chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica* 2010; **95**: 2072–2079.
- 482 Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan X-J *et al.* Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 2012; **119**: 4467–4475.
- 483 Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton L-A, Minga E, Agathangelidis A, Nichelatti M *et al.* Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicentre study. *Lancet Haematol* 2014; **1**: e74–e84.
- 484 Agathangelidis A, Vardi A, Baliakas P, Stamatopoulos K. Stereotyped B-cell receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014; **55**: 2252–2261.
- 485 Sutton L-A, Young E, Baliakas P, Hadzidimitriou A, Moysiadis T, Plevova K *et al.* Different spectra of recurrent gene mutations in subsets of chronic lymphocytic leukemia harboring stereotyped B-cell receptors. *Haematologica*. 2016; **101**: 959–967.
- 486 Navrkalova V, Young E, Baliakas P, Radova L, Sutton L-A, Plevova K *et al.* ATM mutations in major stereotyped subsets of chronic lymphocytic leukemia: enrichment in subset #2 is associated with markedly short telomeres. *Haematologica*. 2016; **101**: e369–e373.
- 487 Ntoufa S, Papakonstantinou N, Apollonio B, Gounari M, Galigalidou C, Fonte E *et al.* B Cell Anergy Modulated by TLR1/2 and the miR-17 approximately 92 Cluster Underlies the Indolent Clinical Course of Chronic Lymphocytic Leukemia Stereotyped Subset #4. *J Immunol* 2016; **196**: 4410–4417.
- 488 Kovacs G, Robrecht S, Fink AM, Bahlo J, Cramer P, von Tresckow J *et al.* Minimal Residual Disease Assessment Improves Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Who Achieve Partial Response: Comprehensive Analysis of Two Phase III Studies of the German CLL Study Group. *J Clin Oncol* 2016; **34**: 3758–3765.
- 489 Kwok M, Rawstron AC, Varghese A, Evans PAS, O'Connor SJM, Doughty C *et al.* Minimal residual disease is an independent predictor for 10-year survival in CLL. *Blood* 2016; **128**: 2770–2773.
- 490 Orfao A, Berkovitch A, Barrera S, Criado I, Lopez A, González M *et al.* Criterios de respuesta en leucemia linfática crónica: importancia en erradicar la enfermedad mínima residual. *Congr Soc Española Hematol y Hemoter* 2017.
- 491 Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004; **103**: 1202–1210.
- 492 Chiorazzi N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 2012; **2012**: 76–87.
- 493 Eichhorst B, Hallek M. Prognostication of chronic lymphocytic leukemia in the era of new agents. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 2016; **2016**: 149–155.
- 494 Parikh SA, Shanafelt TD. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2016; **43**: 233–240.
- 495 Li H, Yi S-H, Xiong W-J, Liu H-M, Lyu R, Wang T-Y *et al.* Chronic Lymphocytic Leukemia Prognostic Index: A New Integrated Scoring System to Predict the Time to First Treatment in Chinese Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Chin Med J (Engl)* 2017; **130**: 135–142.
- 496 International CLL-IPi working group.

- An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2016; **17**: 779–790.
- 497 Landgren O, Albitar M, Ma W, Abbasi F, Hayes RB, Ghia P *et al.* B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2009; **360**: 659–667.
- 498 Lai Y-Y, Huang X-J. Cytogenetic characteristics of B cell chronic lymphocytic leukemia in 275 Chinese patients by fluorescence in situ hybridization: a multicenter study. *Chin Med J (Engl)* 2011; **124**: 2417–2422.
- 499 Kern W, Bacher U, Haferlach C, Dicker F, Alpermann T, Schnittger S *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis is closely related to chronic lymphocytic leukaemia and may be better classified as early-stage CLL. *Br J Haematol* 2012; **157**: 86–96.
- 500 Henriques A, Rodriguez-Caballero A, Nieto WG, Langerak AW, Criado I, Lecrevisse Q *et al.* Combined patterns of IGHV repertoire and cytogenetic/molecular alterations in monoclonal B lymphocytosis versus chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One* 2013; **8**: e67751.
- 501 Henriques A, Rodriguez-Caballero A, Criado I, Langerak AW, Nieto WG, Lecrevisse Q *et al.* Molecular and cytogenetic characterization of expanded B-cell clones from multiclonal versus monoclonal B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Haematologica* 2014; **99**: 897–907.
- 502 Vardi A, Dagklis A, Scarfò L, 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; **121**: 4521–4528.
- 503 Moreira J, Rabe KG, Cerhan JR, Kay NE, Wilson JW, Call TG *et al.* Infectious complications among individuals with clinical monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): a cohort study of newly diagnosed cases compared to controls. *Leukemia* 2013; **27**: 136–141.
- 504 Solomon BM, Chaffee KG, Moreira J, Schwager SM, Cerhan JR, Call TG *et al.* Risk of non-hematologic cancer in individuals with high-count monoclonal B-cell lymphocytosis. *Leukemia* 2016; **30**: 331–6.
- 505 Molica S, Levato D, Dattilo A. Natural history of early chronic lymphocytic leukemia. A single institution study with emphasis on the impact of disease-progression on overall survival. *Haematologica* 1999; **84**: 1094–1099.
- 506 Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, Call TG, Zent CS, Schwager SM *et al.* Survival of patients with clinically identified monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) relative to the age- and sex-matched general population. *Leukemia*. 2012; **26**: 373–376.
- 507 Casabonne D, Almeida J, Nieto WG, Romero A, Fernández-Navarro P, Rodriguez-Caballero A *et al.* Common infectious agents and monoclonal B-cell lymphocytosis: a cross-sectional epidemiological study among healthy adults. *PLoS One* 2012; **7**: e52808.
- 508 Glancy E, Siles R. Monoclonal B-cell lymphocytosis and hypogammaglobulinaemia. *Br. J. Haematol.* 2016; **173**: 316–317.
- 509 Ghia P, Prato G, Stella S, Scielzo C, Geuna M, Caligaris-Cappio F. Age-dependent accumulation of monoclonal CD4+CD8+ double positive T lymphocytes in the peripheral blood of the elderly. *Br J Haematol* 2007; **139**: 780–790.
- 510 Mulligan CS, Thomas ME, Mulligan SP. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2008; **359**: 2065–2066.
- 511 Shanafelt TD, Kay NE, Jenkins G, Call TG, Zent CS, Jelinek DF *et al.* B-cell count and survival: differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-cell lymphocytosis

- based on clinical outcome. *Blood* 2009; **113**: 4188–4196.
- 512 Molica S, Mauro FR, Giannarelli D, Lauria F, Cortelezzi A, Brugiattelli M *et al.* Differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-lymphocytosis according to clinical outcome: on behalf of the GIMEMA chronic lymphoproliferative diseases working group. *Haematologica* 2011; **96**: 277–283.
- 513 Fung SS, Hillier KL, Leger CS, Sandhu I, Vickars LM, Galbraith PF *et al.* Clinical progression and outcome of patients with monoclonal B-cell lymphocytosis. *Leuk Lymphoma* 2007; **48**: 1087–1091.
- 514 Xu W, Li J-Y, Wu Y-J, Cao X, Fan L, Qiao C *et al.* Clinical features and outcome of Chinese patients with monoclonal B-cell lymphocytosis. *Leuk Res* 2009; **33**: 1619–1622.
- 515 Strati P, Shanafelt TD. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood* 2015; **126**: 454–462.
- 516 Oliveira AC, Fernandez de Sevilla A, Domingo A, De La Banda E, Domingo-Domenech E, Mercadal S *et al.* Prospective study of prognostic factors in asymptomatic patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia-like lymphocytosis: the cut-off of $11 \times 10^9/L$ monoclonal lymphocytes better identifies subgroups with different outcomes. *Ann Hematol* 2015; **94**: 627–632.
- 517 Shanafelt TD, Kay NE, Call TG, Zent CS, Jelinek DF, LaPlant B *et al.* MBL or CLL: which classification best categorizes the clinical course of patients with an absolute lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/L$ but a B-cell lymphocyte count $< 5 \times 10^9/L$? *Leuk Res* 2008; **32**: 1458–1461.
- 518 Scarfo L, Zibellini S, Tedeschi A, Maura F, Neri A, Bertazzoni P *et al.* Impact of B-cell count and imaging screening in cMBL: any need to revise the current guidelines? *Leukemia*. 2012; **26**: 1703–1707.
- 519 Molica S, Gentile M, Mauro FR, Brugiattelli M, Federico M, Sperduti I *et al.* An increased number of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis characterizes a recent database of chronic lymphocytic leukemia Rai stage 0. *Acta Haematol* 2012; **127**: 149–151.
- 520 Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Wurzner R *et al.* Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. *J Virol* 2005; **79**: 3675–3683.
- 521 Koch S, Larbi A, Ozcelik D, Solana R, Gouttefangeas C, Attig S *et al.* Cytomegalovirus infection: a driving force in human T cell immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2007; **1114**: 23–35.
- 522 Pawelec G, Derhovanessian E. Role of CMV in immune senescence. *Virus Res* 2011; **157**: 175–179.
- 523 Moro-García MA, Alonso-Arias R, López-Larrea C. When Aging Reaches CD4+ T-Cells: Phenotypic and Functional Changes. *Front Immunol* 2013; **4**: 107.
- 524 Matos DM, Furtado FM, Falcao RP. Monoclonal B-cell lymphocytosis in individuals from sporadic (non-familial) chronic lymphocytic leukemia families persists over time, but does not progress to chronic B-cell lymphoproliferative diseases. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015; **37**: 292–295.
- 525 Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia—an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* 1967; **29**: 566–584.
- 526 Morabito F, Mangiola M, Rapezzi D, Zupo S, Oliva BM, Ferraris AM *et al.* Expression of CD10 by B-chronic lymphocytic leukemia cells

- undergoing apoptosis in vivo and in vitro. *Haematologica* 2003; **88**: 864–873.
- 527 Damle RN, Battliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C *et al.* Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* 2004; **103**: 375–382.
- 528 Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; **20**: 399–413.
- 529 Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G *et al.* Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2011; **20**: 246–259.
- 530 Greaves M. Cancer stem cells: back to Darwin? *Semin Cancer Biol* 2010; **20**: 65–70.
- 531 Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; **481**: 306–313.
- 532 Shlush LI, Hershkovitz D. Clonal evolution models of tumor heterogeneity. *Am Soc Clin Oncol Educ book Am Soc Clin Oncol Meet* 2015; : e662–e665.
- 533 Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of ‘tumor escape’ phenotypes. *Nat Immunol* 2002; **3**: 999–1005.
- 534 Gonzalez-Campos J, Rios-Herranz E, De Blas-Orlando JM, Martin-Noya A, Parody-Ruiz-Berdejo R, Rodriguez-Fernandez JM. Chronic lymphocytic leukemia with two cellular populations: a biphenotypic or biclonal disease. *Ann Hematol* 1997; **74**: 243–246.
- 535 Sanchez M-L, Almeida J, Gonzalez D, Gonzalez M, Garcia-Marcos M-A, Balanzategui A *et al.* Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 2003; **102**: 2994–3002.
- 536 Lanasa MC, Allgood SD, Volkheimer AD, Gockerman JP, Whitesides JF, Goodman BK *et al.* Single-cell analysis reveals oligoclonality among ‘low-count’ monoclonal B-cell lymphocytosis. *Leukemia* 2010; **24**: 133–140.
- 537 Kern W, Bacher U, Schnittger S, Dicker F, Alpermann T, Haferlach T *et al.* Flow cytometric identification of 76 patients with biclonal disease among 5523 patients with chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) and its genetic characterization. *Br J Haematol* 2014; **164**: 565–569.
- 538 Schroeder HWJ, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 1994; **15**: 288–294.
- 539 Duke VM, Gandini D, Sherrington PD, Lin K, Heelan B, Amlot P *et al.* V(H) gene usage differs in germline and mutated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2003; **88**: 1259–1271.
- 540 Coscia M, Pantaleoni F, Riganti C, Vitale C, Rigoni M, Peola S *et al.* IGHV unmutated CLL B cells are more prone to spontaneous apoptosis and subject to environmental prosurvival signals than mutated CLL B cells. *Leukemia* 2011; **25**: 828–837.
- 541 Gaidano G, Foa R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2012; **122**: 3432–3438.
- 542 Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H *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**: 1625–1638.
- 543 Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X *et al.*

- Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; **194**: 1639–1647.
- 544 Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan X-J *et al.* B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002; **99**: 4087–4093.
- 545 Klein U, Goossens T, Fischer M, Kanzler H, Braeuninger A, Rajewsky K *et al.* Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev* 1998; **162**: 261–280.
- 546 Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 323–335.
- 547 Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 161–196.
- 548 Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Durig J *et al.* Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2012; **209**: 2183–2198.
- 549 Hauswirth AW, Almeida J, Nieto WG, Teodosio C, Rodriguez-Caballero A, Romero A *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) with normal lymphocyte counts is associated with decreased numbers of normal circulating B-cell subsets. *Am J Hematol* 2012; **87**: 721–724.
- 550 Marti GE, Shim YK, Albitar M, Middleton D, Abbasi F, Anderson A *et al.* Long-term follow-up of monoclonal B-cell lymphocytosis detected in environmental health studies. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; **78B**: S83–S90.
- 551 Ghia P, Fazi C, Pecciarini L, Scarfò L, Cottini F, Dagklis A *et al.* CLL-Like MBL In the General Population Persist Over Time, without Clinical Progression, Though Carrying the Same Cytogenetic Abnormalities of CLL. *Blood* 2015; **116**: 6618–6626.
- 552 Strati P, Parikh SA, Chaffee KG, Kay NE, Call TG, Achenbach SJ *et al.* Relationship between co-morbidities at diagnosis, survival and ultimate cause of death in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a prospective cohort study. *Br J Haematol* 2017; **178**: 394–402.
- 553 te Raa GD, Pascutti MF, Garcia-Vallejo JJ, Reinen E, Remmerswaal EBM, ten Berge IJM *et al.* CMV-specific CD8+ T-cell function is not impaired in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; **123**: 717–724.
- 554 Lortan JE, Kaniuk AS, Monteil MA. Relationship of in vitro phagocytosis of serotype 14 Streptococcus pneumoniae to specific class and IgG subclass antibody levels in healthy adults. *Clin Exp Immunol* 1993; **91**: 54–57.
- 555 Freeman JA, Crassini KR, Best OG, Forsyth CJ, Mackinlay NJ, Han P *et al.* Immunoglobulin G subclass deficiency and infection risk in 150 patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013; **54**: 99–104.
- 556 Svensson T, Hoglund M, Cherif H. Clinical significance of serum immunoglobulin G subclass deficiency in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Scand J Infect Dis* 2013; **45**: 537–542.
- 557 Rodriguez-Caballero A, Garcia-Montero AC, Barcena P, Almeida J, Ruiz-Cabello F, Tabernero MD *et al.* Expanded cells in monoclonal TCR-alpha-beta+/CD4+/NKa+/CD8-/dim T-LGL lymphocytosis recognize hCMV antigens. *Blood* 2008; **112**: 4609–4616.
- 558 Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000; **343**: 481–492.
- 559 Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F *et al.* Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 4079–4088.

- 560 Moreton P, Kennedy B, Lucas G, Leach M, Rassam SMB, Haynes A *et al.* Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 2971–2979.
- 561 Melchardt T, Weiss L, Greil R, Egle A. Viral infections and their management in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013; **54**: 1602–1613.
- 562 Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol* 2005; **6**: 873–879.
- 563 Fletcher JM, Vukmanovic-Stejic M, Dunne PJ, Birch KE, Cook JE, Jackson SE *et al.* Cytomegalovirus-specific CD4+ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion. *J Immunol* 2005; **175**: 8218–8225.
- 564 Vasto S, Colonna-Romano G, Larbi A, Wikby A, Caruso C, Pawelec G. Role of persistent CMV infection in configuring T cell immunity in the elderly. *Immun Ageing* 2007; **21**: 2.
- 565 Bajwa M, Vita S, Vescovini R, Larsen M, Sansoni P, Terrazzini N *et al.* CMV-Specific T-cell Responses at Older Ages: Broad Responses With a Large Central Memory Component May Be Key to Long-term Survival. *J Infect Dis* 2017; **215**: 1212–1220.
- 566 De Ory Manchón F, Sanz Moreno JC, Castañeda López R, Ramírez Fernández R, León Rega P, Pachón Del Amo I. Seroepidemiología frente a citomegalovirus en la comunidad de Madrid. *Rev Esp Salud Publica* 2001; **75**: 55–62.
- 567 Lopo S, Vinagre E, Palminha P, Paixão MT, Nogueira P, Freitas MG. Seroprevalence to cytomegalovirus in the portuguese population, 2002-2003. *Eurosurveillance* 2011; **16**: 2002–2003.
- 568 Agathangelidis A, Ntoufa S, Stamatopoulos K. B cell receptor and antigens in CLL. *Adv Exp Med Biol* 2013; **792**: 1–24.
- 569 Safdar A, Rodriguez GH, Rueda AM, Wierda WG, Ferrajoli A, Musher DM *et al.* Multiple-dose granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor plus 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine in patients with chronic lymphocytic leukemia: a prospective, randomized trial of safety and immunogenicity. *Cancer* 2008; **113**: 383–387.
- 570 Sinisalo M, Aittoniemi J, Oivanen P, Käyhty H, Olander RM, Vilpo J. Response to vaccination against different types of antigens in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; **114**: 107–10.
- 571 Sinisalo M, Aittoniemi J, Käyhty H, Vilpo J. Vaccination against infections in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; **44**: 649–652.
- 572 Sinisalo M, Vilpo J, Itälä M, Väkeväinen M, Taurio J, Aittoniemi J. Efficacy of pneumococcal vaccination on chronic lymphocytic leukemia: Should we rely on surrogate markers? *Vaccine* 2008; **26**: 3959.
- 573 Pasiarski M, Rolinski J, Grywalska E, Stelmach-Goldys A, Korona-Glowniak I, Gozdz S *et al.* Antibody and plasmablast response to 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in chronic lymphocytic leukemia patients - Preliminary report. *PLoS One* 2014; **9**: 1–14.
- 574 Lindström V, Aittoniemi J, Salmenniemi U, Käyhty H, Huhtala H, Itälä-Remes M *et al.* Antibody persistence after pneumococcal conjugate vaccination in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hum Vaccin Immunother* 2018; en prensa desde 8 febrero 2018; 10.1080/21645515.2.

Anexo I

MATERIAL SUPLEMENTARIO CORRESPONDIENTE AL

ARTÍCULO 1

“La linfocitosis B monoclonal de bajo recuento persiste tras 7 años de seguimiento y se asocia a menor supervivencia”

En esta sección se recogen: 1) los materiales y métodos suplementarios, haciendo especial hincapié en los paneles de anticuerpos monoclonales y sondas fluorescentes utilizadas en citometría de flujo e hibridación in situ (iFISH), respectivamente; 2) las características clínicas y biológicas de los sujetos con clones LBM^{lo} tipo no-LLC, de acuerdo a su clasificación fenotípica; 3) análisis comparativo del tipo y frecuencia de alteraciones citogenéticas en muestras pareadas de sujetos con LBM^{lo} considerando el momento basal y tras 7 años de seguimiento; 4) la distribución de las principales poblaciones de linfocitos T y células NK en sangre periférica de sujetos con LBM^{lo} tipo LLC tras 7 años de seguimiento vs. adultos sanos con la misma distribución de edad y sexo; 5) resultados del análisis multivariante para definir los factores asociados de manera independiente con el riesgo de muerte de los sujetos analizados; 6) estudio comparativo de la frecuencia de fallecimientos en la población general de Salamanca vs. sujetos con LBM^{lo} en el periodo 2015-2016; 7) listado de todos los médicos del servicio de Atención Primaria de Salamanca que han participado en el estudio.

Haematologica, marzo de 2018.

DOI: 10.3324/haematol.2017.183954.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary methods

Flow cytometry immunophenotypic studies. A total amount of between 1 and 4 mL of EDTA-anticoagulated PB per case and follow-up time point was immunophenotyped, using either a direct immunofluorescence stain-and-then-lyse technique^{1,2} or following a “Bulk Lysis Protocol” (www.EuroFlow.org) (Supplementary Table 1); per sample, cells were stained with both a “*screening tube*” for the analysis of the distribution of the different lymphocyte subsets, and a “*characterization tube*”, aimed at the identification and characterization of the B-cell clone(s). Panels A and B in Supplementary Table 1 detail the composition of each “tube” for samples stained at baseline, while Panels C and D in Supplementary Table 1 show the antibody combinations for staining samples collected during follow-up.

For detection of clonal B-cell populations, $\geq 5 \times 10^6$ cells were measured in a FACSCanto II flow cytometer –Becton/Dickinson Biosciences (BD), San José, CA-. Instrument setup, calibration and daily quality control were performed according to well-established protocols.^{3,4} All cases defined as MBL^{lo} showed ≥ 1 clonal -imbalanced surface membrane (sm) Ig kappa/smlg lambda ratio of $>3:1$ or $<1:3$ - and/or aberrant B-cell population, showing either a CLL-like phenotype (CD19⁺ CD20^{lo} CD5^{+/++} smlg^{lo}) or any other non-CLL-like aberrant B-cell phenotype.^{1,2} The minimum number of clustered events required to define a population was of ≥ 50 cells.^{1,2}

Statistical analyses. Conventional descriptive and comparative statistics –Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests, as well as Wilcoxon and Friedman tests, and the Spearman correlation test– were performed for all relevant variables. For objective evaluation of sequential changes in the number of clonal B-cells per subject, a 99% confidence interval (CI) was estimated per sample, using a resampling bootstrap method that takes into account random variation in the size of each clonal B-cell population;^{5,6} values above or below the baseline 99% CI were considered to be real changes in the size of the B-cell clones studied during follow-up. Overall survival (OS) curves were plotted according to the method of Kaplan-Meier and the (one-sided) log-rank test was used to compare OS curves of MBL^{lo} subjects vs. (age- and sex-matched) non-MBL^{lo} controls from the general population studied in parallel at baseline.

Information regarding the status (alive vs. death) of both groups was collected from the Spanish Index of Deaths (INDEF, *Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*, Madrid, Spain). Multivariate analyses using the Cox regression model was performed to predict the variables independently associated with a greater/lower risk of death. Mortality data -including causes of death- for the general population from the same geographical area for the 2008-2016 period was obtained from the Spanish Statistical Office (www.ine.es). A predictive linear regression model was built to estimate the time CLL-like MBL^{lo} clones might potentially take to progress to MBL^{hi} and CLL. Statistical significance was set at P-values ≤ 0.05 . All statistical analyses were performed with SPSS 19.0 software (SPSS-IBM, Armonk, NY), except for the bootstrap calculations and the linear regression model, that were accomplished with MATLAB R2015a (Mathworks, Natick, MA).

Supplementary Tables

SUPPLEMENTARY TABLE 1.- Combination of fluorochrome-conjugated antibodies used for the immunophenotypic analysis of peripheral blood samples by flow cytometry

A. Screening tube used at baseline (“stain-and-then-lyse” SOP $\geq 5 \times 10^6$ cells analyzed)^{1,2}

Fluorochrome	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	AF700
Marker	CD20	CD45	CD8+anti- λ	CD56+anti-k	CD4	CD19	CD3	CD38
Clone	2H7	HI30	UCHT4+ polyclonal	C5.9+ polyclonal	L200	J3-119	SK7	HIT2
Source	eBioscience	Invitrogen	BD+Dako	BD+Dako	BD	Beckman Coulter	BD	Exbio

B. MBL^{lo} characterization tube used at baseline (“stain-and-then-lyse” SOP with $\geq 5 \times 10^6$ cells analyzed)^{1,2}

Fluorochrome	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	AF700
Marker	CD20	CD45	Anti-k	Anti- λ	CD19	CD10	CD5	CD38
Clone	2H7	HI30	Polyclonal	Polyclonal	HIB19	HI10a	L17F12	HIT2
Source	eBioscience	Invitrogen	Dako	Dako	BD	BD	BD	Exbio

C. LST (EuroFlow® Lymphocyte Screening Tube): used at follow-up (EuroFlow “Bulk Lysis” SOP with $\geq 5 \times 10^6$ cells analyzed)

Fluorochrome	PacB	OC515	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
Marker	CD20+ CD4	CD45	CD8+ Anti-k	CD56+ Anti- λ	CD5	CD19+ anti-TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38
Clone	2H7+ RPA-T4	HI30	UCHT4+ polyclonal	C5.9+ polyclonal	HIB19	HI10a+ 11F2	UCHT2	HB7
Source	eBioscience +BD	Cytognos	Cytognos	Cytognos	BD	Beckman Coulter+BD	BD	BD

D. MBL^{lo} characterization tube used at follow-up (EuroFlow “Bulk Lysis” SOP with $\geq 5 \times 10^6$ cells analyzed)

Fluorochrome	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	AF700
Marker	CD20	CD27	CD5	CD305	CD79b	CD19	CD3+ anti-k	anti- λ
Clone	2H7	L128	UCHT2	DX26	3A2-2E7	J3-119	SK7+ Polyclonal	Polyclonal
Source	eBioscience	BD	BD	BD	BD	Beckman Coulter	BD+ Cytognos	Cytognos

“Stain-and-then-lyse” and “Bulk Lysis” protocols were compared in parallel and no statistical differences were found regarding the detection of normal B-cells, clonal B-cells or any of the major cell populations in the peripheral blood.^{3,4} For more detailed protocols please see www.EuroFlow.org. Abbreviations (alphabetical order): **AF700**: alexa fluor® 700; **APC**: allophycocyanine; **APCH7**: allophycocyanine-hilite®7; **BV510**: brilliant violet™ 510; **FITC**: fluorescein isothiocyanate; **MBL^{lo}**: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **OC515**: orange Cytognos 515; **PacB**: pacific blue™; **PE**: phycoerythrin; **PECy7**: phycoerythrin-cyanine7; **PerCPCy5.5**: peridinin chlorophyll protein-complex cyanine 5.5. Manufacturers (alphabetical order): Becton Dickinson Biosciences (BD), San José, CA; Beckman Coulter, Brea, CA; Cytognos, Salamanca, Spain; Affymetrix eBioscience (eBioscience), San Diego, CA; ExBio, Vestec, Czech Republic; Invitrogen (ThermoFisher Scientific), Waltham, MA.

SUPPLEMENTARY TABLE 2.- Panel of probes and fluorochromes used for interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH) studies and the corresponding chromosomal regions targeted

Probe name	Fluorophore	Targeted chromosome band/ region	Probe size (Kb) [#]
<i>Custom Kit for CLL-like clones</i>			
<i>ATM</i>	SG	11q22.3	180
<i>D12Z3</i>	SA	12p11.1-q11	NA
<i>D13S25</i>	SGo	13q14.3	306
<i>P53</i>	SR	17p13.1	159
<i>LSI IGH DC BA</i>	SO/SG	14q32	250/900
<i>Probes for other non-CLL B-CLPD</i>			
<i>LSI IGH/CCND1 DC DF</i>	SO/SR	11q13/14q32	942/1500
<i>LSI IGH/BCL2 DC DF</i>	SG/SO	14q32.3/18q21.3	1600/870
<i>ON 7q32/SE7 DC</i>	SR/SG	7q32.1/7p11.1-q11	682/NA
<i>LSI BCL6 DC BA</i>	SO/SG	3q27	349/816
<i>LSI MALT DC BA</i>	SO/SG	18q21	600/765

[#]Information obtained from Kreatech Diagnostics, CytoCell Ltd. and Vysis Inc. Customized probes kits from Kreatech Diagnostics (Amsterdam, The Netherlands), CytoCell Ltd. (Cambridge, UK) and Vysis Inc. (Abbott Park, IL, USA). Abbreviations (alphabetical order): **BA**: break-apart probe; **B-CLPD**: B-cell chronic lymphoproliferative disorder; **CLL**: chronic lymphocytic leukemia; **DC**: dual color; **DF**: dual fusion; **IGH**: heavy chain immunoglobulin; **LSI**: locus specific identifier; **NA**: not applicable; **SA**: spectrum aqua; **SE**: α-satellite centromeric probe; **SG**: spectrum green; **SGo**: spectrum gold; **SO**: spectrum orange; **SR**: spectrum red.

SUPPLEMENTARY TABLE 3.- Clinical and biological characteristics of non CLL-like MBL^{lo} subjects distributed by phenotypic category at baseline and after 7y follow-up.

	MZL-like (n=6)		HCL-like (n=1)		MCL-like (n=2)		Unclassifiable non-CLL B-CLPD (n=2)	
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up
Follow-up time (months)	NA	84 (66-87)	NA	84	NA	63 (63-63)	NA	85 (83-86)
Male/Female*	2/4 (33%/67%)		1/0 (100%/0%)		2/0 (100%/0%)		2/0 (100%/0%)	
% Leukocytosis (>10x10 ⁹ /L)*	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
% Lymphocytosis (>4x10 ⁹ /L)*	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
% Cytopenias*	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
N. total T cells/μL	1086 (796-1965)	1459 (755-2908)	808	792	1101 (1091-1111)	614 (276-953)	1161 (1655-1667)	1662 (1448-1877)
N. CD4 ⁺ T cells/μL	611 (351-1395)	857 (447-1995)	457	570	645 (467-824)	238 (184-293)	784 (732-836)	717 (629-805)
N. CD8 ⁺ T cells/μL	445 (307-522)	628 (273-848)	315	203	423 (237-609)	349 (66-633)	661 (572-750)	619 (404-833)
N. CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T cells/μL	4.9 (1.8-27)	8.2 (1.1-29)	0.51	2.0	2.2 (0.19-4.3)	9.5 (8.7-10)	5.6 (4.9-6.2)	12 (7.6-16)
N. CD4 ⁺ /CD8 ⁻ T cells/μL	15 (11-107)	35 (8.1-141)	36	16	31 (11-50)	17 (15-19)	211 (167-254)	315 (222-407)
N. NK cells/μL	426 (150-668)	412 (252-914)	799	938	571 (173-848)	285 (178-392)	263 (248-279)	313 (276-361)
N. total B cells/μL	173 (45-1066)	335 (49-1208)	26	73	611 (47-1173)	80 (22-138)	149 (137-160)	196 (110-203)
N. normal B cells/μL	77 (35-125)	43 (25-104)	23	22	59 (46-72)	35 (21-49)	114 (92-136)	124 (58-190)
N. clonal B cells/μL	87 (4.7-980)	288 (12-1149)	3.1	52	551 (1.4-1101)	45 (1.3-90)	34 (0.62-68)	74 (2.7-144)
% cases with ≥2 MBL clones*	3 (50%)	3 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
% Lymphadenopathies*	0 (0%)	1 # (17%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
% Progression to B-CLPD*	NA	0 (0%)	NA	0 (0%)	NA	0 (0%)	NA	0 (0%)
% Deaths*	NA	0 (0%)	NA	0 (0%)	NA	1 (50%)	NA	0 (0%)

Results expressed as median (range) or as * number of cases (percentage).

A single axillar adenopathy (size 1x1cm).

Abbreviations (alphabetical order): **B-CLPD**: B-cell chronic lymphoproliferative disorder; **HCL**: hairy cell leukemia; **MBL^{lo}**: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **MCL**: mantle cell lymphoma; **MZL**: marginal zone lymphoma; **N.**: number, **NA**: not applicable.

SUPPLEMENTARY TABLE 4.- Frequency of CLL-associated cytogenetic alterations and percentage of cells affected by each genetic abnormality in the 21 individuals evaluated both at baseline and at follow-up.

	All MBL ^{lo} cases (n=21)		CLL-like MBL ^{lo} cases (n=18)		Non-CLL-like MBL ^{lo} cases (n=3)		P-value
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	
Chromosomal region							
del(13q14)(D13S25)	4/15 (27%)	8/15 (53%)	4/14 (29%)	8/14 (57%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	<0.04 ^{a,b}
% altered cells	50±40%	55±36%	(50±40%)	55±36%	NA	NA	
Trisomy 12	2/14 (14%)	2/14 (14%)	1/13 (7.7%)	1/13 (7.7%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	NS
% altered cells	34±35%	45±35%	59%	70%	9%	20%	
del(11q)(ATM)	1/9 (11%)	1/9 (11%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	NS
% altered cells	8%	50%	NA	NA	8%	50%	
del(17p)(TP53)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	NS
% altered cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	

Results expressed as number of cases (percentage of cases) and mean ± SD of percentage of cells affected by each specific genetic alteration. ^a Baseline vs. follow-up (year +7) for all cases, ^b Baseline vs. follow-up (year +7) for CLL-like MBL cases, ^c Baseline vs. follow-up (year +7) for non CLL-like MBL cases. Abbreviations (alphabetical order): **CLL**: chronic lymphocytic leukemia; **MBL^{lo}**: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **NA**: not applicable; **NS**: not statistically significantly different (P>0.05).

SUPPLEMENTARY TABLE 5.- Absolute number of distinct circulating peripheral blood lymphocyte subsets in CLL-like MBL^{lo} subjects and age- and gender-matched non-MBL healthy donors

	Non-MBL HD (n=250)	#CLL-like MBL ^{lo} subjects (n=56)	P-value
Gender (Male/Female)*	114/136 (46%/54%)	22/34 (39%/61%)	NS
Age (years)	73 (49-97)	75 (49-91)	NS
N. of Total T cells/ μ L	1092 (435-2951)	1508 (460-3753)	<0.001
N. of CD4 ⁺ T cells/ μ L	643 (125-1659)	898 (227-2045)	<0.001
N. of CD8 ⁺ T cells/ μ L	362 (13-1939)	479 (96-1742)	<0.01
N. of CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T cells/ μ L	7.1 (0.71-74)	8.1 (1.3-147)	NS
N. of CD4 ⁺ /CD8 ⁻ T cells/ μ L	35 (2.7-212)	65 (1.9-338)	<0.001
N. of normal B cells/ μ L	119 (16-776)	138 (26-536)	NS
N. of NK cells/ μ L	291 (39-1215)	373 (89-3415)	<0.01

Results expressed as median (range) or as * number of cases (percentage). #2/56 individuals simultaneously carried at least one CLL-like clone and a non-CLL-like clone. Abbreviations (alphabetical order): **CLL**: chronic lymphocytic leukemia; **HD**: healthy donors; **MBL^{lo}**: low-count monoclonal B lymphocytosis; **N.**: number; **NA**: not applicable; **NK**: natural killer; **NS**: no statistically significant differences (P>0.05).

SUPPLEMENTARY TABLE 6.- List of variables studied in the Cox Regression model and their corresponding hazard ratios (HR) (95% confidence intervals; CI) and P-values for their association with OS for the whole MBL^{lo} plus non-MBL cohort.

Variables	HR (95%CI)	P-value
Whole cohort		
Cardiovascular disease	2.65 (1.30 - 5.41)	0.007
Age (<65y vs. ≥65y)	5.08 (1.48 - 17.49)	0.01
Solid tumor	2.86 (1.26 - 6.46)	0.01
MBL^{lo} clones	2.14 (0.97 - 4.72)	0.06
N. of PB neutrophils (/μL)	1.00 (1.00 - 1.001)	0.12
N. of PB CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T cells (/μL)	1.02 (0.99 - 1.04)	0.20
Diabetes	0.56 (0.22 - 1.45)	0.23
N. of PB CD4 ⁺ T cells (/μL)	0.99 (0.99 - 1.00)	0.23
N. of PB monocytes (/μL)	1.001 (0.99 - 1.00)	0.30
Severe infections	0.99 (0.99 - 1.00)	0.30
Hypertension	1.45 (0.68 - 3.11)	0.34
Exposure to toxics	1.34 (0.65 - 2.76)	0.43
N. of PB CD4 ⁺ /CD8 ⁻ T cells (/μL)	1.25 (0.52 - 3.00)	0.62
N. of PB eosinophils (/μL)	0.99 (0.99 - 1.00)	0.69
Psychiatric disorders	0.99 (0.99 - 1.00)	0.69
Gender	1.09 (0.39 - 3.07)	0.86
Autoimmune diseases	0.94 (0.43 - 2.04)	0.87
N. of PB CD8 ⁺ T cells (/μL)	0.90 (0.10 - 8.56)	0.93

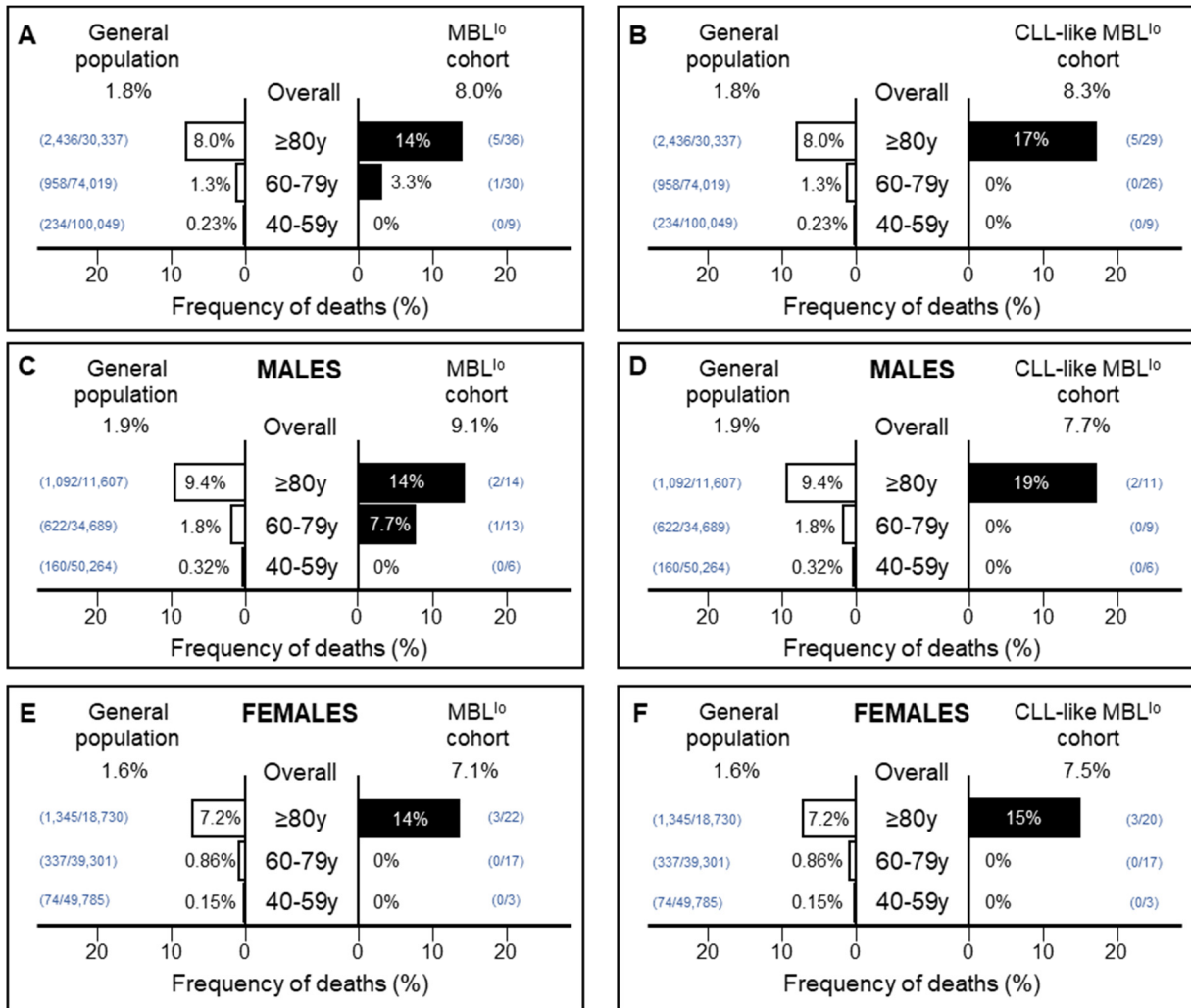
Abbreviations (alphabetical order): **CI**: confidence interval; **HR**: hazard ratio; **MBL^{lo}**: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **N.**: number; **OS**: overall survival; **PB**: peripheral blood.

REFERENCES TO SUPPLEMENTARY METHODS AND TABLES:

1. Nieto WG, Almeida J, Romero 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.
2. Nieto WG, Teodosio C, López A, et al. Non-CLL-like monoclonal B-Cell lymphocytosis in the general population: Prevalence and phenotypic/genetic characteristics. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;**78**(Suppl. 1):24–34.
3. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;**26**(9):1986–2010.
4. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;**31**(10):2094–2103.
5. Efron B, Tibshirani R. Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals, and other measures of statistical accuracy. *Stat Sci*. 1986;**1**(1):54–77.
6. Bradley E, Tibshirani R. An introduction to the Bootstrap. Boca Raton, FL (United States): Taylor&Francis; 1994.

Supplementary Figures

SUPPLEMENTARY FIGURE 1.



SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Death frequencies among MBL^{lo} individuals vs. the general population of Salamanca region occurring between January 2015 and December 2016. Panels A and B represent the frequency of deaths by age group for the general population of Salamanca (white) vs. that of MBL^{lo} and CLL-like MBL^{lo} individuals (black), respectively. Panels C and D illustrate the frequency of deaths for males from the general population vs. the whole MBL^{lo} cohort and CLL-like MBL^{lo} individuals, respectively, whereas Panels E and F show the same comparisons for females.

Primary Health Care Group of Salamanca for the study of MBL:

List of members (alphabetical order): Alonso Martín, María Monserrat (C.S. Fuentes de Oñoro); Asensio Oliva, María Carmen (C.S. Santa Marta de Tormes), Báñez Hernández, Pilar (C.S. Garrido Sur); Cabo Sastre, Luis (C.S. Ledesma); Carreño Luengo, María Teresa (C.S. Ledesma); Casado Romo, José María (C.S. Alba de Tormes); Cubino Luis, Rocio (C.S. Sancti Spiritus); De Vega Parra, José (C.S. Peñaranda); Franco Esteban, Eloy (C.S. Pizarrales-Vidal); García García, María Concepción (C.S. Guijuelo); García Rodríguez, Bernardo Lucio (C.S. La Alberca); Garzón Martín, Agustín (C.S. Peñaranda); Goenaga Andrés, Rosario (C.S. Ledesma); Gómez Cabrera, Rosalia (C.S. Garrido Sur); Gómez Sánchez, Francisco (C.S. Periurbana Norte); González Moreno, Josefa (C.S. Guijuelo); González Vicente, Ángel Carlos (C.S. Aldeadávila de la Ribera); Guarido Mateos, José Manuel (C.S. Vitigudino); Hernández Sánchez, María Jesús (C.S. Vitigudino); Herraes Martín, Ricardo (C.S. La Alberca); Herrero Sánchez, Amparo (C.S. Fuentes de Oñoro); Jiménez Ruano, María Josefa (C.S. Garrido Norte); Jimeno Cascón, Teresa Basa (C.S. Elena Ginel Díez); Macías Kuhn, Francisco (C.S. Ledesma); Mateos Rubio, Pablo (C.S. Ledesma); Márquez Velasco, María Salud (C.S. Sancti Spiritus); Merino Palazuelo, Miguel (C.S. Fuentes de Oñoro); Miguel Lozano, Rubén (C.S. Garrido Norte); Montero Luengo, Juan (C.S. San Juan); Muriel Díaz, María Paz (C.S. Miguel Armijo); Pablos Regueiro, Araceli (C.S. Vitigudino); Pascual Martín, J. Antonio (C.S. Fuentes de Oñoro); Pastor Alcalá, Luis (C.S. Vitigudino); Pedraza García, Jesús (C.S. Vitigudino); Pérez Díaz, Manuel (C.S. Pizarrales-Vidal); Pérez García, Manuel (C.S. Alba de Tormes); Prieto Gutiérrez, María Teresa (C.S. Peñaranda); Ramos Arranz, Manuel (C.S. Ledesma); Ramos Mongue, Aurora Esther (C.S. Ledesma); Rodríguez Medina, Ana María (C.S. Alba de Tormes); Rodríguez Vegas, Margarita (C.S. Ledesma); Romo Cortina, Javier (C.S. Elena Ginel Díez); Roselló Carmen, Elena (C.S. Vitigudino); Sánchez Alonso, Begoña (C.S. Aldeadávila de la Ribera); Sánchez Bazo, Begoña (C.S. Aldeadávila de la Ribera), Sánchez White, Nicolás (C.S. Sancti Spiritus); Sandín Pérez, Rafael (C.S. San José); Sanz Santa-Cruz, Fernando (C.S. Capuchinos); Soto Jiménez, Francisco (C.S. Santa Marta de Tormes); Velasco Marcos, María Auxiliadora (C.S. Elena Ginel Díez); Vicente López, Horacio Marcos (C.S. Aldeadávila de la Ribera); Vicente Santos, M. Sebastián (C.S. Aldeadávila de la Ribera).

MATERIAL SUPLEMENTARIO CORRESPONDIENTE AL
ARTÍCULO 2

“La linfocitosis B monoclonal y la leucemia linfática crónica muestran diferentes perfiles en la distribución de los linfocitos B normales residuales en sangre periférica”

En esta sección se recogen: 1) los materiales y métodos suplementarios, haciendo especial hincapié en los paneles de anticuerpos monoclonales y sondas fluorescentes utilizadas en citometría de flujo e hibridación in situ (iFISH), respectivamente; 2) la estrategia de análisis utilizada para la identificación de las diferentes poblaciones de linfocitos B aquí estudiados; 3) las principales características clínicas y biológicas de todos los sujetos participantes, de acuerdo a su distribución por grupo de estudio; 4) la distribución en números absolutos de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B y células plasmáticas, así como los niveles solubles de las diferentes subclases de inmunoglobulina, para cada uno de los grupos de estudio, y 5) la relación del número absoluto de estas poblaciones y niveles solubles de inmunoglobulina con la edad.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Material and Methods:

Subjects and samples. A total of 110 subjects –61 males (55%) and 49 females (45%); mean age of 72 ± 11 y– were prospectively enrolled in this study between January 2015 and June 2017. Subjects were classified into: controls (40 non-MBL^{lo} adult healthy donors), low-count monoclonal B-cell lymphocytosis –MBL^{lo}– (n=27), high-count monoclonal B-cell lymphocytosis –MBL^{hi}– (n=21) and Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia –CLL-0– patients (n=22). Controls and MBL^{lo} subjects were recruited at the Primary Health Care Service of Salamanca (Salamanca, Spain), while MBL^{hi} and untreated/newly-diagnosed CLL-0 patients were recruited at the Service of Hematology of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain) and the *Nuestra Señora del Prado* Hospital (Toledo, Spain). According to the WHO 2017 criteria, diagnosis of CLL-like MBL was established whenever $< 5 \times 10^9$ peripheral blood (PB) clonal B-cells/L with a CLL-like immunophenotype were detected, in the absence of any other CLL-associated symptoms or signs of disease.¹ MBL was further subdivided into MBL^{lo} ($< 0.5 \times 10^9$ CLL-like clonal B-cells/L) and MBL^{hi} ($\geq 0.5 \times 10^9$ CLL-like clonal B-cells/L).¹ In turn, diagnosis of CLL was made following the WHO-2017 and the International Workshop on CLL criteria.^{1,2}

Inclusion criteria for controls were as follows: i) age > 40 y, ii) absence of recent infectious diseases, and iii) no current or past history of autoimmune diseases or any immunomodulatory treatment (e.g. corticosteroids, chemotherapy), including administration of intravenous immunoglobulins. All subjects gave their written informed consent to participate, and the study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca/IBSAL.

Flowcytometry immunophenotypic studies. Between 1-2 ml EDTA-anticoagulated PB were collected/case and within 24h, lysed using ammonium chloride and stained with a panel of fluorochrome-conjugated antibodies, following well-established protocols^{3,4} and previously validated antibody combinations (Supplementary Table 1).⁵ These combinations of monoclonal antibodies allowed identification of CLL-like and CLL clonal cells as well as the main normal PB B-cell populations (i.e. immature, naïve, plasma cells and memory B cells), including the subsets of antigen-experienced B-cells expressing different Ig isotypes and subclasses according to their

distinct phenotypes as described elsewhere,⁵⁻⁷ and detailed in Supplementary Table 2. For each sample, $\geq 5 \times 10^6$ total PB leukocytes were measured in a FACSCanto II (8-color panel) or an LSR Fortessa X-20 (14-color panel) flow cytometer –Becton/Dickinson Biosciences (BD), San José, CA–. Instrument setup, calibration and daily quality control were performed following the EuroFlow standard operating procedures (SOP) available at www.EuroFlow.org. For data analysis the INFINICYT™ V2.0 software (Cytognos, Salamanca, Spain) was used.

Interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH) and *IGHV* mutational status analyses.

Fluorescence-activated cell sorting (FACS)-sorted ($\geq 95\%$ purity) clonal B-cell populations were investigated for the presence of CLL-related cytogenetic alterations (Supplementary Table 3) – i.e. del(13q14)(*D13S25*), trisomy 12, del(11q)(*ATM*) and del(17p)(*TP53*)–, and their *IGHV* gene rearrangements and mutational status, as described elsewhere.⁸⁻¹⁰ The IMGT database (www.imgt.cines.org) was used to analyze the *IGHV* sequences obtained; sequences with an *IGHV* germline identity $< 98\%$ were considered to be mutated (M), while those with $\geq 98\%$ germline identity were classified as unmutated (UM).^{11,12}

Quantitation of plasma soluble Ig isotype-subclass levels. Soluble IgM and IgG₁₋₄ subclass levels were evaluated in platelet-depleted plasma samples using conventional nephelometry – Dimension Vista® (Siemens Healthcare, Erlanger, Germany)–, and IgA₁₋₂ levels were assessed using the SPAPLUS® turbidimetric system (Binding Site, Birmingham, UK); for both approaches, the manufacturers SOPs and recommendations were strictly followed.

Statistical analyses. The Mann-Whitney U and Chi-square tests were used to establish the statistical significance of differences observed between groups for continuous and categorical variables, respectively. *P*-values ≤ 0.05 were considered to be associated with statistical significance. All statistical analyses were performed using the SPSS V19.0 software (SPSS-IBM, Armonk, NY).

Supplementary Tables

SUPPLEMENTARY TABLE 1. Combinations of fluorochrome-conjugated antibodies used for flow cytometric immunophenotypic identification and characterization of PB B-cell subsets in each subject included in this study.

LST (EuroFlow® Lymphocyte Screening Tube):

8-color tube acquired in a FACSCanto II (BD) flow cytometer used for the identification of the major leukocyte populations in PB

Fluorochrome	PacB	OC515	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APC-H7
Marker	CD20 + CD4	CD45	CD8 + Anti-K	CD56 + Anti-λ	CD5	CD19 + anti-TCRγδ	CD3	CD38
Clone	2H7 + RPA-T4	HI30	UCHT-4 + Polyclonal	C5.9 + Polyclonal	HIB19	HI10a + 11F2	UCHT2	HB7
Source	eBioscience + BD	Cytognos	Cytognos	Cytognos	BD	Beckman Coulter + BD	BD	BD

Abbreviations (alphabetical order): **APC**: allophycocyanine; **APCH7**: allophycocyanine-hilite®7; **BD**: Becton/Dickinson Biosciences; **FITC**: fluorescein isothiocyanate; **PacB**: pacific blue™; **PE**: phycoerythrin; **PECy7**: phycoerythrin-cyanine7; **PerCPCy5.5**: peridinin chlorophyll protein cyanine 5.5; **OC515**: Orange Cytognos 515.

EuroFlow® Ig isotype subclass B-cell tube:

12-color tube acquired in an LSR Fortessa X-20 (BD) instrument and used for the identification of the different subsets of normal residual PB B-cells including those defined by the expression of distinct Ig-subclasses

Fluorochrome	BV421	BV510	BV605	BV711	BV786	FITC	PerCP-Cy5.5	PE	PE-CF594	PECy7	APC	APC-H7
Marker	CD27	smlgM	CD5	CD21	CD19	smlgG3 + smlgG2	smlgA1 + smlgA2	smlgG1 + smlgG2	smlgD	CD20	smlgG4 + smlgA1	CD38
Clone	M-T271	MHM-88	UCHT2	B-ly4	SJ25C1	SAG3 + SAG2	SAA1 + SAA2	SAG1 + SAG2	IA6-2	2H7	SAA1 + SAG4	HB7
Source	BD	Biologend	BD	BD	BD	Cytognos	Cytognos	Cytognos	BD	BD	Cytognos	BD

Abbreviations (alphabetical order): **APC**: allophycocyanine; **APCH7**: allophycocyanine-hilite®7; **BD**: Becton/Dickinson Biosciences; **BV421**: brilliant violet 421; **BV510**: brilliant violet 510; **BV605**: brilliant violet 605; **BV711**: brilliant violet 711; **BV786**: brilliant violet 786; **FITC**: fluorescein isothiocyanate; **PE**: phycoerythrin; **PE-CF594**: phycoerythrin-carboxyfluorescein594; **PECy7**: phycoerythrin-cyanine7; **PerCPCy5.5**: peridinin chlorophyll protein cyanine 5.5.

SUPPLEMENTARY TABLE 2. Phenotypic profiles and criteria used for the identification of the different PB circulating B-cell subsets.

Phenotypic markers	PB B-cell and PC populations					
	Immature B-cells	Naïve B-cells	Un-switched Memory B-cells	Switched Memory B-cells	Un-switched Plasma cells	Switched Plasma cells
CD5	+	+/-	-	-	-	-
CD19	+	+	+	+	+ ^{lo}	+ ^{lo}
CD20	+	+	+	+	+ ^{lo}	+ ^{lo}
CD21	+	+/-	+/-	+/-	-	-
CD27	-	-	+	+/-	++	++
CD38	+	-	-	-	++	++
sIgM	++	+	+	-	+ ^{lo}	-
sIgD	+	++	+	-	-	-
sIgG ₁₋₄ or sIgA ₁₋₂	-	-	-	+#	-	+#

#Each switched memory B-cell or plasma cell only expresses one of the possible IgG or IgA subclasses at a time. Immunophenotypes in this table were defined according to Sims et al., Agrawal et al and Blanco et al.¹³⁻¹⁵

SUPPLEMENTARY TABLE 3. Panel of fluorochrome-conjugated probes used for interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH) studies and the corresponding chromosomal regions targeted.

Probe name	Fluorophore	Targeted chromosome band/region	Probe size (Kb) [#]
<i>Custom Kit for CLL-like clones in MBL^{lo}.</i>			
<i>ATM</i>	SG	11q22.3	180
<i>D12Z3</i>	SA	12p11.1-q11	NA
<i>D13S25</i>	SGo	13q14.3	306
<i>P53</i>	SR	17p13.1	159
<i>LSI IGH DC BA</i>	SO/SG	14q32	250/900
<i>Probes for MBL^{hi} and CLL</i>			
<i>LSI ATM</i>	SO	11q22	230
<i>D12Z3</i>	SO	12p11.1-q11	NA
<i>LSI D13S25</i>	SO	13q14.3	160
<i>LSI TP53</i>	SO	17p13	145
<i>LSI IGH DC BA</i>	SO/SG	14q32	250/900

[#]Information obtained from Kreatech Diagnostics (Amsterdam, The Netherlands), CytoCell Ltd. (Cambridge, UK) and Vysis Inc. (Abbott Park, IL). Customized probes kits from CytoCell Ltd. Abbreviations (alphabetical order): **BA**: break apart; **LSI**: locus specific identifier; **NA**: not applicable; **SA**: spectrum aqua; **SG**: spectrum green; **SGo**: spectrum gold; **SO**: spectrum orange; **SR**: spectrum red.

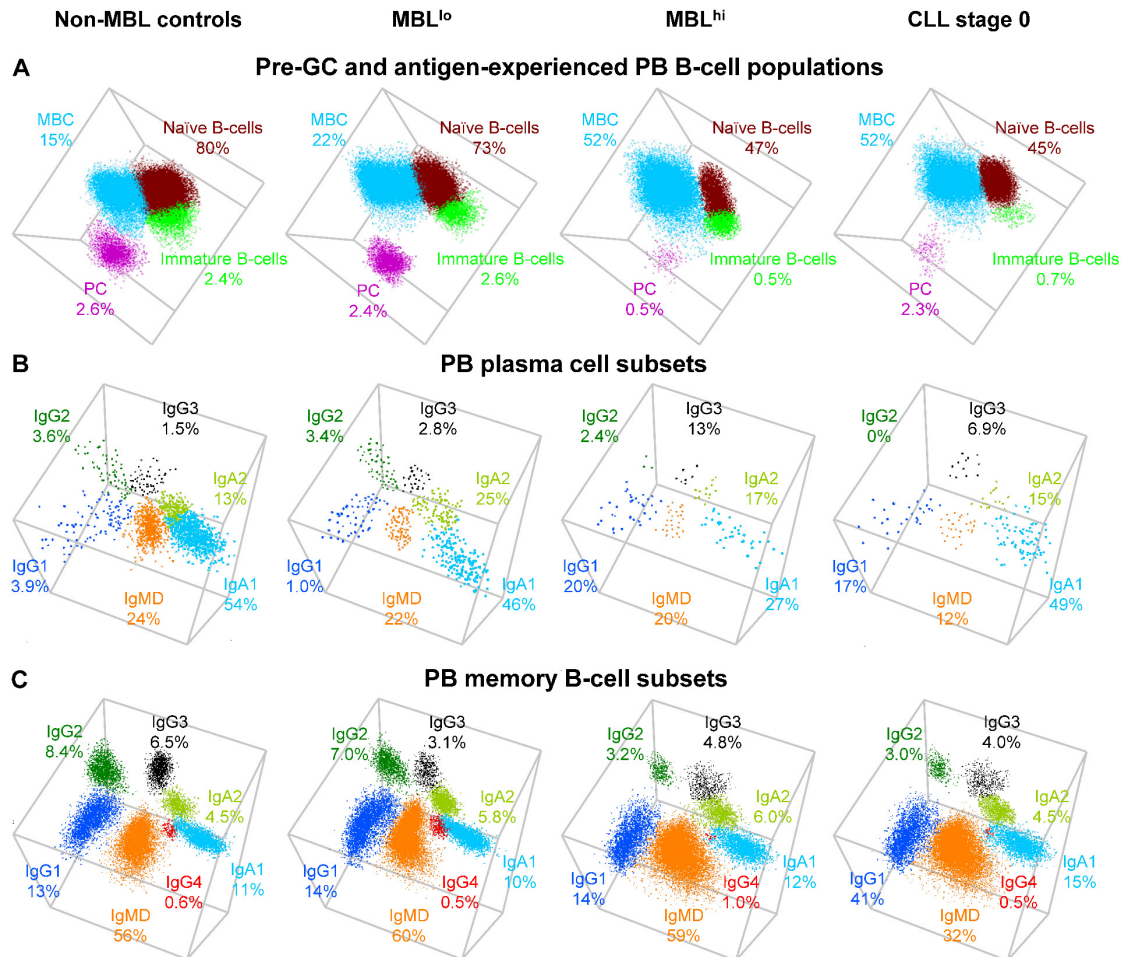
SUPPLEMENTARY TABLE 4. Clinical and biological characteristics of MBL and CLL subjects vs. non-MBL healthy controls.

	Controls (n=40)	MBL ^{lo} (n=27)	MBL ^{hi} (n=21)	CLL Rai stage 0 (n=22)	P-value
Male / Female [#]	18 / 22 (45%/55%)	14 / 13 (52%/48%)	16 / 5 (76%/24%)	13 / 9 (59%/41%)	0.02 ^b
Age (years)	71 (52-96)	74 (52-91)	75 (58-92)	72 (52-89)	NS
Neutropenia [#] (<1 000/ μ L)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NS
N. leukocytes / μ L	7 050 (4 340-10 390)	6 820 (3 010-11 630)	11 120 (6 400-19 300)	24 560 (10 050-85 740)	<0.001 ^{b,d,c,e,f}
N. lymphocytes / μ L	2 341 (938-4 057)	2 135 (621-5 103)	5 433 (1 910-7 576)	19 533 (7 590-77 126)	0.01 ^{d,c,e,f}
N. total T cells / μ L	1 693 (636-3 130)	1 592 (460-3 018)	1 688 (744-3 048)	2 045 (1 042-5 349)	0.02 ^e
N. CD4 ⁺ T cells / μ L	1 067 (345-1 615)	835 (227-2 045)	894 (584-2 179)	1 193 (522-3 426)	0.03 ^e
N. CD8 ⁺ T cells / μ L	520 (146-1 653)	528 (182-1 742)	498 (55-1 495)	729 (178-1 577)	NS
N. CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T cells / μ L	7.0 (0-156)	6.7 (1.5-23)	8.5 (0.62-79)	11 (2.4-306)	0.03 ^e
N. CD4 ⁻ /CD8 ⁻ T cells / μ L	80 (4.2-354)	66 (16-254)	61 (1.7-344)	107 (19-461)	0.04 ^{c,f}
N. NK cells / μ L	345 (135-1 273)	428 (89-1 854)	303 (31-1 157)	453 (68-1 030)	NS
N. total B cells / μ L	182 (48-359)	146 (26-614)	2 675 (691-4 610)	16 040 (5 241-73 014)	<0.001 ^{b,c,e,f}
N. normal B cells / μ L	182 (48-359)	140 (21-480)	93 (8.2-740)	78 (3.7-1 022)	<0.001 ^{b,d,c,e,f}
N. clonal B cells / μ L	NA	1.7 (0.04-326)	2 529 (509-4 602)	15 964 (5 207-72 673)	<0.02 ^{d,e,f}
IGHV mutational status [#] (M / UM)	NA	9 / 2 (82%/18%)	19 / 0 (100%/0%)	15 / 6 (71%/29%)	<0.05 ^{d,f}
<i>Cytogenetic alterations</i>					
TOTAL altered cases [#]	NA	15/23 (65%)	14/19 (74%)	16/21 (76%)	NS
del(13q14)(D13S25) [#]	NA	15/23 (65%)	12/19 (63%)	12/21 (57%)	NS
Trisomy 12 [#]	NA	0/23 (0%)	2/19 (5%)	3/20 (15%)	NS
del(11q)(ATM) [#]	NA	0/23 (0%)	1/19 (5%)	0/20 (0%)	NS
del(17p13)(TP53) [#]	NA	0/23 (0%)	0/19 (0%)	1/20 (5%)	NS
t(14q32) [#]	NA	1/8 (13%)	1/4 (25%)	0/1 (0%)	NS
% of altered cells/case	NA	17 (5-100)	58 (12-97)	81 (13-99)	<0.03 ^{d,e}

Results expressed as median (range) or as # number of cases (percentage). ^a Controls vs. MBL^{lo}, ^b Controls vs. MBL^{hi}, ^c Controls vs. CLL, ^d MBL^{lo} vs. MBL^{hi}, ^e MBL^{lo} vs. CLL ^f MBL^{hi} vs. CLL. Abbreviations (alphabetical order): **CLL**: chronic lymphocytic leukemia; **M**: mutated *IGHV*; **MBL^{hi}**: high-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **MBL^{lo}**: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **N**: Number; **NA**: Not applicable; **NS**: statistically not significantly different (p>0.05); **UM**: unmutated *IGHV*.

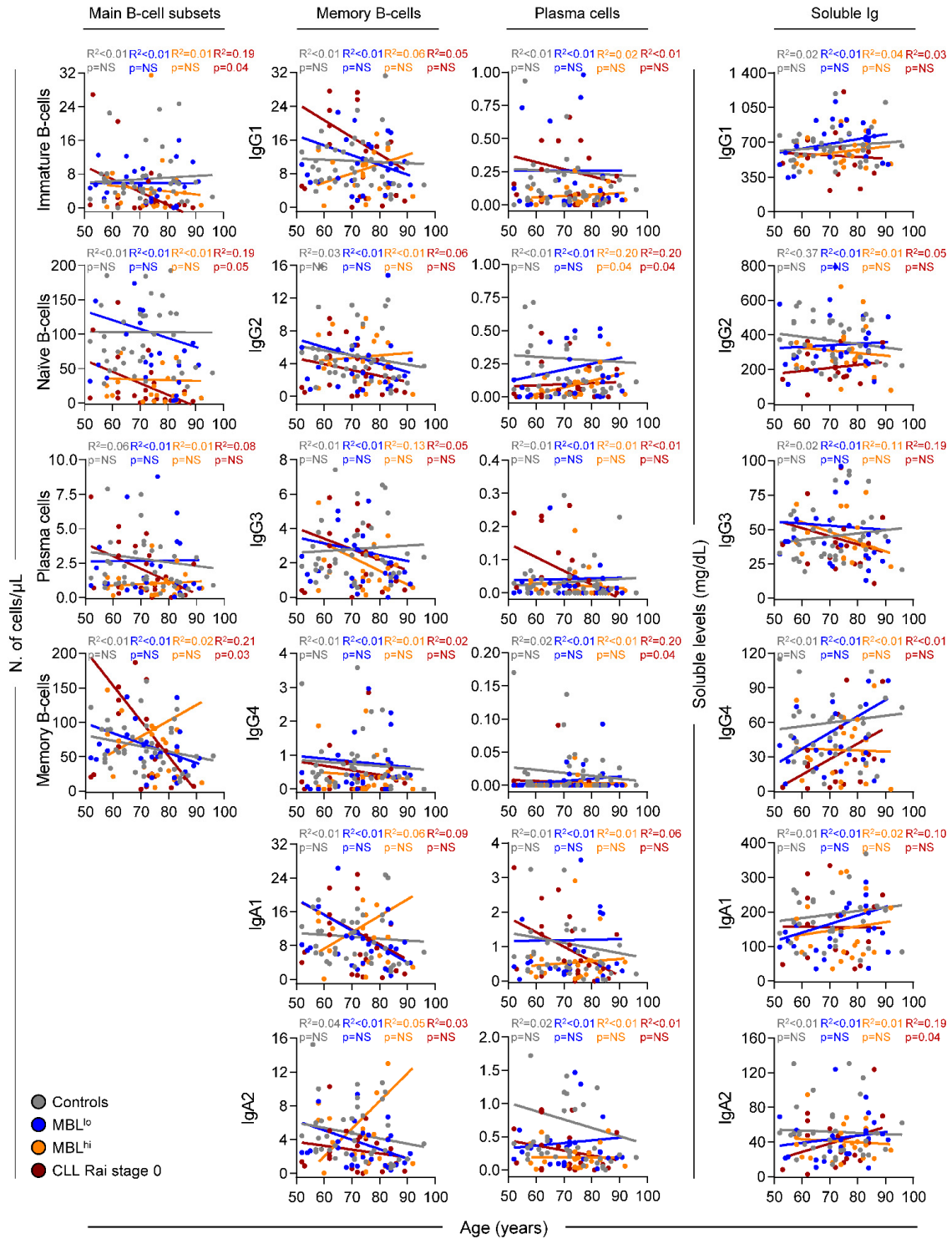
Supplementary figures

SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Relative distribution of distinct PB B-cell populations including the subsets of memory B-cells and plasma cells expressing distinct surface immunoglobulin heavy chain (IgH)-isotype subclasses in four representative subjects from the non-MBL controls, MBL^{lo}, MBL^{hi} and CLL stage 0 study groups.



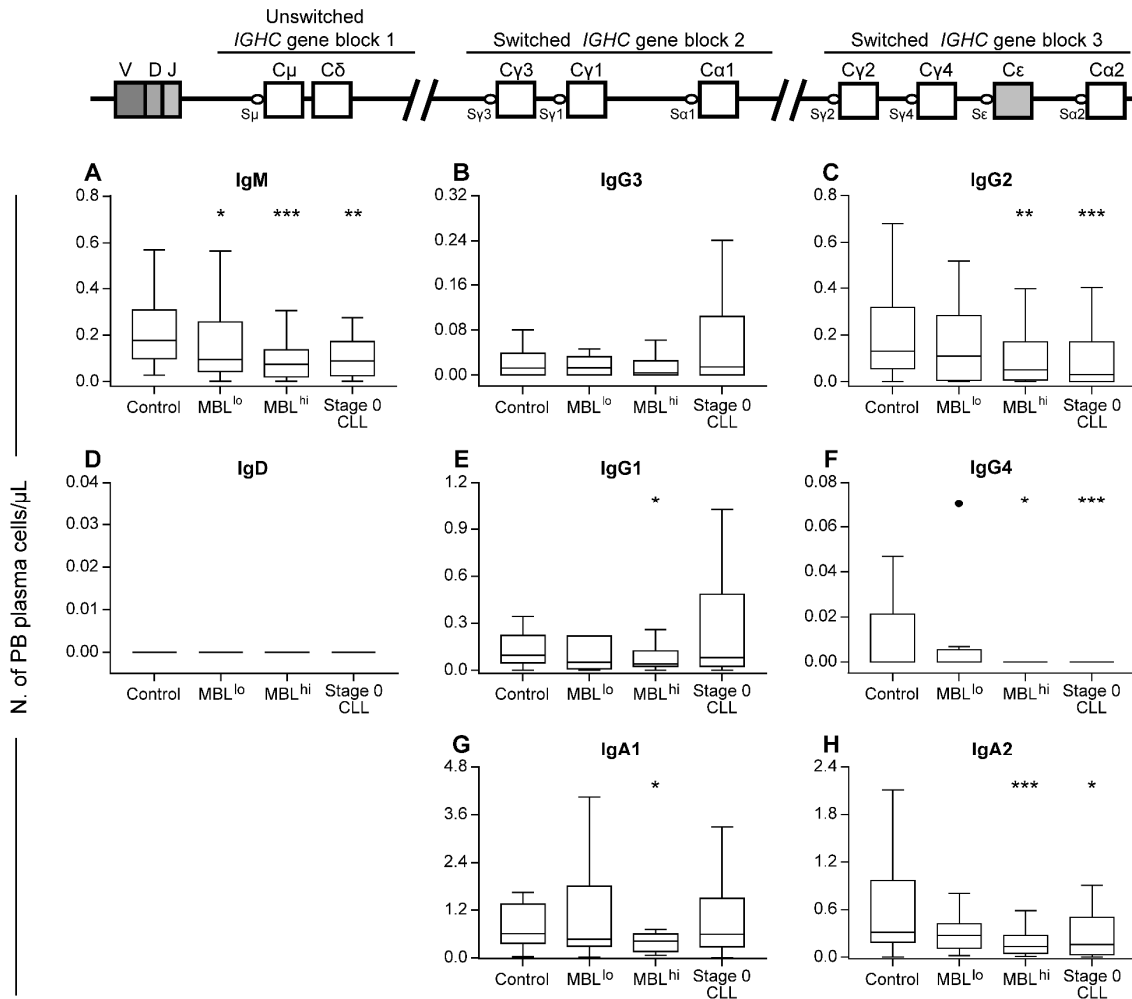
Panel A depicts the relative distribution (from total normal PB B-cells) of pre-germinal center (i.e. immature and naïve B-cells) vs. antigen-experienced B-cells (i.e. memory B-cells and plasma cells) for each of the four cases. **Panels B and C** show the relative (percent) distribution (from total PB memory B cells and total PB plasma cells) of the subsets of memory B-cells and plasma cells expressing different IgH isotypes and subclasses for each case, respectively. Each plot depicts 3-dimensional automated population separator (APS) view -Principal Component 1 (PC1) vs. PC2 vs. PC3- dot plots obtained from a single representative case within each group of subjects included in this study. **MBL^{lo}**: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **MBL^{hi}**: high-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **CLL**: chronic lymphocytic leukemia; **MBC**: memory B-cells; **PC**: plasma cells. Color codes are identified in each plot.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Correlation between age and the absolute number of the major total B-cells, memory B-cells and plasma cells and their isotype subclass subsets, as well as the soluble Ig plasma levels in MBL^{lo}, MBL^{hi}, CLL and non-MBL controls subjects.



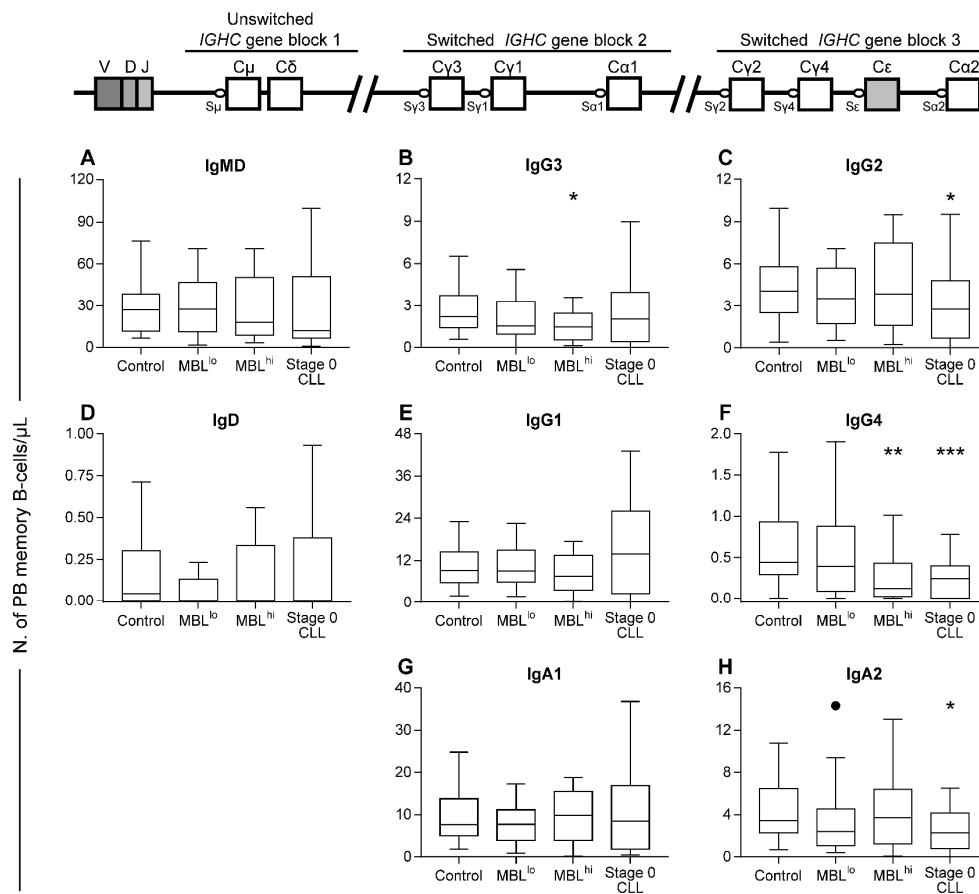
Data plotted in each diagram depicts the Pearson's lineal correlation coefficient (R²) and its significance (p-value) for age vs. the absolute number of each B-cell subset as well as age vs. Ig soluble plasma levels for individuals within each study group. Color codes as follows: non-MBL control, grey; MBL^{lo}, blue; MBL^{hi}, orange; and CLL Rai stage 0, red.

SUPPLEMENTARY FIGURE 3. Distribution of plasma cell subsets expressing different surface immunoglobulin heavy chain (sIgH) isotype-subclasses in peripheral blood of MBL and CLL cases vs. non-MBL controls.



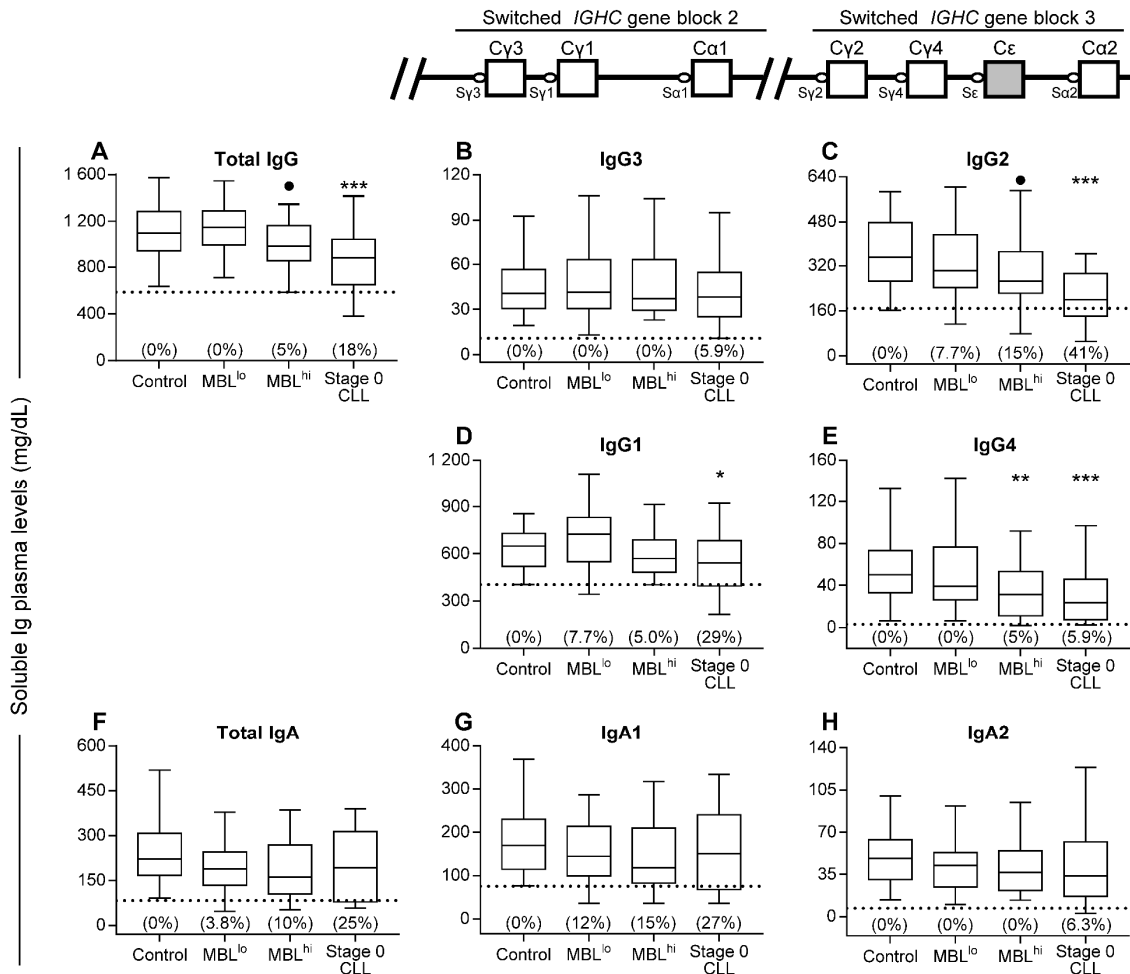
Panels A and D show the distribution in absolute numbers of un-switched IgM⁺ and IgD⁺ plasma cells, respectively. **Panels B, E and G** show the absolute number of IgG3⁺, IgG1⁺ and IgA1⁺ switched plasma cells, respectively. **Panels C, F and H** depict the distribution in absolute numbers of IgG2⁺, IgG4⁺ and IgA2⁺ plasma cells, respectively. The relative position and order of gene segments of the *IGHC* gene that encode for the different Ig-subclasses are depicted in the top of the figure. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the lines in the middle correspond to median values (50th percentile) and vertical lines represent the highest and lowest values that are neither outliers nor extreme values. * $P \leq 0.05$ vs. controls; ** $P \leq 0.01$ vs. controls; *** $P \leq 0.001$ vs. controls and * $P < 0.08$ vs. controls. **MBL^{lo}**: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **MBL^{hi}**: high-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **CLL**: chronic lymphocytic leukemia.

SUPPLEMENTARY FIGURE 4: Distribution of memory B-cell subsets expressing different surface immunoglobulin heavy chain (sIgH) isotype subclasses in peripheral blood of MBL and CLL cases vs. non-MBL controls.



Panels A and D show the distribution in absolute numbers of un-switched IgMD⁺ and IgD-only memory B-cells, respectively. **Panels B, E and G** depict the absolute numbers of IgG3⁺, IgG1⁺ and IgA1⁺ switched memory B-cells, respectively. **Panels C, F and H** depict the distribution in absolute numbers of IgG2⁺, IgG4⁺ and IgA2⁺ memory B-cells, respectively. The relative position and order of gene segments of the *IGHC* gene that encode for the different Ig-subclasses are depicted in the top of the figure. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the lines in the middle correspond to median values (50th percentile) and vertical lines represent the highest and lowest values that are neither outliers nor extreme values. * $P \leq 0.05$ vs. controls; ** $P \leq 0.01$ vs. controls; *** $P \leq 0.001$ vs. controls and * $P < 0.08$ vs. controls. **MBL^{lo}**: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **MBL^{hi}**: high-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **CLL**: chronic lymphocytic leukemia.

SUPPLEMENTARY FIGURE 5. Distribution of soluble plasma levels of the main Ig isotype subclasses in MBL^{lo}, MBL^{hi} and CLL cases vs. non-MBL healthy subjects (controls).



Panel A shows the titer of total plasma IgG. **Panels B, C, D and E** represent the plasma titers of soluble IgG3, IgG2 and IgG1 and IgG4 subclasses, respectively. In turn, **Panel F** displays the plasma levels of total IgA, while **Panels G and H** show the plasma titers of IgA1 and IgA2 subclasses, respectively. Dotted lines correspond to the lower range of normality for each Ig-subclasses, and percentages depict the frequency of cases below the normal range. The relative position and order of gene segments of the *IGHC* gene that encode for the different Ig-subclasses are depicted in the top of the figure. * $P \leq 0.05$ vs. controls; ** $P \leq 0.01$ vs. controls; *** $P \leq 0.001$ vs. controls and * $P < 0.08$ vs. controls. **MBL^{lo}**: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **MBL^{hi}**: high-count monoclonal B-cell lymphocytosis; **CLL**: chronic lymphocytic leukemia.

SUPPLEMENTARY REFERENCES:

- 1 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *et al.* *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. IARC: Lyon (France), 2017.
- 2 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H *et al.* Guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment and supportive management of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2018, e-pub ahead of print 14 March 2018; doi:10.1182/blood-2017-09-806398.
- 3 Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M *et al.* EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012; **26**: 1986–2010.
- 4 Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S *et al.* Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017; **31**: 2094–2103.
- 5 Blanco E, Perez-Andres M, Sanoja-Flores L, Wentink M, Pelak O, Martín-Ayuso M *et al.* Selection and validation of antibody clones against IgG and IgA subclasses in switched memory B-cells and plasma cells. *J Immunol Methods* 2017, e-pub ahead of print 28 September 2017; doi:10.1016/j.jim.2017.09.008.
- 6 Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J *et al.* Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; **78 Suppl 1**: 47-60.
- 7 Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM *et al.* Circulating human b and plasma cells. age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138 plasma cells. *Haematologica* 2010; **95**: 1016–1020.
- 8 Quijano S, López A, Rasillo A, Sayagués JM, Barrena S, Sánchez ML *et al.* Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2008; **74**: 139–149.
- 9 van Dongen JJM, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; **17**: 2257–2317.
- 10 Rodríguez-Caballero A, Henriques A, Criado I, Langerak AW, Matarras S, López A *et al.* Subjects with chronic lymphocytic leukaemia-like B-cell clones with stereotyped B-cell receptors frequently show MDS-associated phenotypes on myeloid cells. *Br J Haematol* 2015; **168**: 258–267.
- 11 Damle RN, Wasil T, 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**: 1840–1847.
- 12 Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1848–1854.
- 13 Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005; **105**: 4390–4398.
- 14 Agrawal S, Smith SABC, Tangye SG, Sewell WA. Transitional B cell subsets in human bone marrow. *Clin Exp Immunol* 2013; **174**: 53–59.
- 15 Blanco E, Perez-Andres M, Arriba-Mendez S, Contreras-Sanfeliciano T, Criado I, Pelak O *et al.* Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 2018, e-pub ahead of print 2 March 2018; doi:10.1016/j.jaci.2018.02.017.

MATERIAL SUPLEMENTARIO CORRESPONDIENTE AL
ARTÍCULO 3

“Respuesta inmune específica frente a virus recurrentes y S. pneumoniae en linfocitosis B monoclonal y leucemia linfática crónica: implicaciones en la progresión de la enfermedad”

En esta sección se recogen: 1) los materiales y métodos suplementarios, especialmente en relación a las técnicas de nefelometría y quimioluminiscencia utilizadas para la determinación de los niveles de inmunoglobulina soluble; 2) las combinaciones de anticuerpos monoclonales utilizados para la identificación de las poblaciones de linfocitos B clonales mediante citometría de flujo; 3) los reactivos comerciales utilizados para la cuantificación de los niveles de inmunoglobulina específica frente a CMV, VEB, virus de la gripe y S. pneumoniae; 4) análisis comparativo de la seroprevalencia para CMV y VEB en cada uno de los grupos de sujetos analizados; 5) la distribución de los títulos de IgM e IgG específicos de CMV, VEB y virus de la gripe para cada grupo de estudio.

Haematologica, julio de 2017; 102(7):1238-1246

DOI: 10.3324/haematol.2016.159012

SUPPLEMENTARY TABLE 1.-Combinations of fluorochrome-conjugated antibodies used for the immunophenotypic analysis of peripheral blood samples by flow cytometry.

Panel A: LST (EuroFlow®) (Lymphocyte Screening Tube) performed in all subjects studied. For MBL^{lo} ≥ 5x10⁶ PB cells were evaluated, while for MBL^{hi} and CLL ≥ 5x10⁵ cells were analyzed.

Fluorochrome	PacB	OC515	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
Marker	CD20/ CD4	CD45	CD8/ anti- Lambda	CD56/ anti- Kappa	CD5	CD19/ anti- TCR	CD3	CD38
Clone	2H7/ RPA-T4	GA90	UCHT4/ Polyclonal	C5.9/ Polyclonal	L17F12	J3- 119/11F2	SK7	HB7
Manufacturer	eBioscience/ BD	Cytognos	Cytognos	Cytognos	BD	Beckman Coulter /BD	BD	BD

Panel B: Single 8-color 9- antibody combination used for the specific characterization of clonal B cells in MBL^{lo} (≥ of 5x10⁶ nucleated cells analyzed/case).

Fluorochrome	PacB	BV510	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
Marker	CD20	CD27	CD5	CD305	CD79b	CD19	CD3/ anti- Kappa	anti- Lambda
Clone	2H7	L128	UCHT2	DX26	3A2-2E7	J3-119	SK7/ Polyclonal	Polyclonal
Manufacturer	eBioscience	BD	BD	BD	BD	Beckman Coulter	BD/ Cytognos	Cytognos

Panel C: Single 8-color antibody combination used for the characterization of clonal B cells in MBL^{hi} and CLL (≥ of 5x10⁶ nucleated cells analyzed/case).

Fluorochrome	PacB	OC515	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
Marker	CD20	CD45	CD23	CD305	CD5	CD19	CD200	CD43
Clone	2H7	GA90	EBVCS5	DX26	L17F12	J3-119	OX-104	1610
Manufacturer	eBioscience	Cytognos	BD	BD	BD	Beckman Coulter	BD	BD

Abbreviations (alphabetical order): **Ab**, antibody; **Alexa750**, Alexa Fluor® 750; **APC**, Allophycocyanin; **APCH7**, Allophycocyanin-Hilite®7; **BD**, Becton/Dickinson Biosciences®; **BV515**, Brilliant Violet™ 510; **CLL**, chronic lymphocytic leukemia; **MBL^{lo}**, low-count monoclonal B lymphocytosis; **MBL^{hi}**, high-count monoclonal B lymphocytosis; **OC515**, Orange Cytognos™ 515; **FITC**, fluorescein isothiocyanate; **PacB**, Pacific Blue™; **PE**, phycoerythrin; **PECy7**, phycoerythrin-cyanine7; **PerCPCy5.5**, peridinin chlorophyll cyanine5.5.

SUPPLEMENTARY TABLE 2.-Technical features of commercially available kits used for the detection of pathogen -specific plasma immunoglobulin (Ig) levels.

Pathogen	Ig detected isotype	Antigen	Platform	Sensitivity	Commercial Source
Cytomegalovirus (CMV)	IgM	AD169 strain	Architect®	<0.85 Index	ABBOT Diagnostics
	IgG	AD169 strain	Architect®	<0.6 AU/ml	ABBOT Diagnostics
Epstein-Barr Virus (EBV)	IgM	VCA	Architect®	<0.50 RLU	ABBOT Diagnostics
	IgG	VCA	Architect®	<0.75 RLU	ABBOT Diagnostics
	IgG	EBNA	Architect®	<0.01 S/CO	ABBOT Diagnostics
Influenza A	IgM	VR 822™strain	ELISA	<0.5 O.D	Vircell
	IgG	VR 822™strain	ELISA	<0.5 O.D	Vircell
Influenza B	IgM	VR 791™strain	ELISA	<0.5 O.D	Vircell
	IgG	VR 791™strain	ELISA	<0.5 O.D	Vircell
Pneumococcus	IgG	anti-PCP*	ELISA	<0.07 O.D	Binding Site

*Pneumococcal Capsular Polysaccharide. This kit is prepared for the identification of 23 different serotypes of Pneumococcus (serotypes 1-5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F and 33F).

Abbreviations (alphabetical order): AU, arbitrary units; EBNA, Epstein-Barr virus nuclear antigen; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; Ig, immunoglobulin; RLU, relative light units; O.D, optical density; S/CO, sample/cut-off; VCA, viral capsid antigen.

SUPPLEMENTARY TABLE 3.-Distribution of CMV, EBV and Influenza virus seropositive healthy donors, MBL^{lo} and MBL^{hi} subjects and CLL patients.

	Healthy donors	MBL ^{lo}	MBL ^{hi}	CLL Stage A	CLL Stage B/C	CLL
Cytomegalovirus+ (CMV)	72 (97%)	67 (99%)	19 (91%)	28 (93%)	18 (95%)	46 (94%)
Epstein-Barr Virus+ (EBV)	74 (100%)	68 (100%)	19 (91%)	30 (100%)	19 (100%)	49 (100%)
Influenza+ (A or B strain)	42 (57%)	34 (50%)	7 (33%)	12 (70%)	10 (100%)	22 (82%)

Cases vaccinated against Influenza

	13 (18%)	6 (8.8%)	1 (4.8%)	4 (24%)	4 (40%)	8 (30%)
--	-------------	-------------	-------------	------------	------------	------------

Cut-off values for seropositivity were established according to the recommended values provided by the corresponding manufacturers of each reagent kit. No statistically significant differences ($p > 0.05$) among the groups for any pathogen-specific Ig plasma levels. Abbreviations (alphabetical order): **CLL**, chronic lymphocytic leukemia; **Ig**, immunoglobulin; **MBL^{lo}**, low-count monoclonal B lymphocytosis; **MBL^{hi}**, high-count monoclonal B lymphocytosis.

